

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik

im Klinikum Steglitz

Direktoren: Prof. Dr. Hans von Krefß und Prof. Dr. Max Schwab

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANGIOTENSINASE-AKTIVITÄT
IM SERUM VON
GESUNDEN, SCHWANGEREN, HYPERTONIKERN UND
LEBERKRANKEN
MIT HILFE EINES DPN · H-ABHÄNGIGEN OPTISCHEN TESTS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

1971

vorgelegt von

Irmgard Ursula Pohlmann, geb. von Goldacker

aus Braunau

Aus der Medizinischen Klinik und
Poliklinik im Klinikum Steglitz

Direktoren: Prof. Dr. Hans von Kreß
und Prof. Dr. Max Schwab

Untersuchungen über die Angiotensinase-Aktivität
im Serum von
Gesunden, Schwangeren, Hypertonikern und Leberkranken
mit Hilfe eines DPN-H-abhängigen optischen Tests

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Irmgard Ursula Pohlmann, geb. von Goldacker
aus Braunau

Berlin 1970

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Oelkers

Korreferent: Prof. Dr. med. Gerhard Laudahn



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12. März 1971

INHALTSVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS	S. 5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	S. 17
A. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM	
I. Renin	S. 18
II. Angiotensinogen und Angiotensin	S. 19
III. Angiotensinasen (Überblick)	S. 22
IV. Das Renin-Angiotensin-System und der renale Hypertonus	S. 23
B. METHODEN UND ERGEBNISSE DER ANGIOTENSINASEN- FORSCHUNG	
I. Methoden	S. 26
II. Ergebnisse früherer Untersuchungen	S. 28
C. FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT	S. 35
D. EXPERIMENTELLER TEIL	
I. Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der ATase-Aktivität im Serum	
1. Prinzip der Methode	S. 38
2. Herstellung der Asparaginase	S. 39
3. Herstellung der Substratlösung	S. 43
4. Praktische Ausführung der ATase- Bestimmung	S. 43

II. Biochemische Eigenschaften der ATase

1. MichaeliskonstanteS. 45
2. pH-OptimumS. 46

III. Versuche mit natürlichem AT II und β -AT II S. 47

IV. Bestimmung der ATase-Aktivität im Serum von Gesunden, Schwangeren, Hypertonikern und Leberkranken

1. Beschreibung der Versuchspersonen
 - a) NormotonikerS. 48
 - b) SchwangereS. 49
 - c) Patienten mit 'essentieller' HypertonieS. 49
 - d) Hypertoniker mit Nierenarterienstenose (NAS)S. 49
 - e) Patienten mit NierenparenchymerkrankungenS. 50
 - f) Patienten mit LebererkrankungenS. 50
2. Zusätzliche UntersuchungenS. 50
3. ErgebnisseS. 51

E. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

- I. MethodikS. 56
- II. Biochemische DatenS. 57
- III. Angiotensin-InfusionstestS. 58

IV. Unterschiedliche Inaktivierung von AT II und AT II-Amid	S. 59
V. Klinische Untersuchungen	S. 61
VI. LAP-Aktivität gegenüber AT II-Amid	S. 66
F. ZUSAMMENFASSUNG	S. 68
ANHANG: VERSUCHSPROTOKOLLE	S. 70
Abbildungen	S. 101

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ames, R.P., A.J. Borkowski, A.M. Sicinski, and J.H. Laragh:
Prolonged Infusion of Angiotensin II and Norepinephrine and Blood Pressure, Electrolyte Balance and Aldosterone and Cortisol Secretion in Normal Man and in Cirrhosis with Ascites
J. clin. Invest. 44, 1171, 1965
2. Arakawa, K., R.R. Smeby, and F.M. Bumpus:
Synthesis of Succinyl¹-Isoleucyl⁵-AT II and N-(Poly-O-Acetyl Seryl)-Isoleucyl⁵-AT I
J. Amer. chem. Soc. 84, 1424, 1962
3. August, J.H., D.H. Nelson, and D.W. Thorn:
Response of Normal Subjects to Large Amounts of Aldosterone
J. clin. Invest. 37, 1449, 1958
4. Barraclough, M.A., N.F. Jones, and C.D. Marschen:
Effect of Angiotensin on Renal Function in the Rat
Amer. J. Physiol. 212, 1153, 1967
5. Bartter, F.C., P. Pronove, J.R. Gill, and R.C. McCardle:
Hyperplasia of the Juxtaglomerular Complex with Hyperaldosteronism and Hypokalemic Alkalosis
Amer. J. Med. 33, 811, 1962
6. Behal, F.J., R.D. Hamilton, C.B. Kavanage, and E.C. Kelly:
Studies on Aminopeptidases in Human Blood
Arch. Biochem. Biophys. 100, 308, 1963
7. Biron, P., W.P. Baldus, and W.H.J. Summerskill:
Plasma Angiotensinase Activity in Cirrhosis
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 116, 1074, 1964
8. Blair-West, J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton, J.R. Goding, J.A. Munro, and R.D. Wright:
The Reduction of the Pressor Action of Angiotensin II in Sodium Deficient Conscious Sheep
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 41, 369, 1963
9. Braun-Menéndez, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir, and J.M. Munoz:
The Substance Causing Renal Hypertension
J. Physiol. (London) 98, 283, 1940

10. Braun-Menéndez, E., J.C.Fasciolo, L.F.Leloir, and J.M. Munoz:
Farmacologia de la Hipertensina
Rev. Soc. Argent. Biol. 16, 398, 1940
11. Braun-Menéndez, E., J.C.Fasciolo, L.F.Leloir, J.M. Munoz, and A.C.Taquini:
Renal Hypertension
Springfield (Ill.) C.C. Thomas, 1946
12. Braun-Menéndez, E.:
Pharmacology of Renin and Hypertensin
Pharmacol. Rev. 8, 25, 1956
13. Brown, J.J., D.L.Davies, A.F. Lever, and J.I.S. Robertson:
Influence of Sodium Loading and Sodium Depletion on Plasma Renin in Man
Lancet II, 278, 1963
14. Brown, J.J., D.L.Davies, P.B. Doak, A.F.Lever, and J.I. S. Robertson:
Plasma-Renin in Normal Pregnancy
Lancet II, 900, 1963
15. Brown, J.J., D.L.Davies, A.F.Lever, and J.I.S. Robertson:
Plasma Renin Concentration in Human Hypertension II. Renin in Relation to Aetiology
Brit. med. J. II, 1215, 1965
16. Brown, J.J., D.L.Davies, A.F.Lever, and J.I.S. Robertson:
Relationship between Sodium Balance, Renin and Aldosterone in Physiological and Pathological Situations in Man
Cihta Symposium on Hypertension ed. P. Tcherdakoff, Paris: Expansion Scientifique
17. Brunner, H. und D. Regoli:
Unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Angiotensinderivate gegen Abbau durch Plasma oder Nierenhomogenat
Experientia 18, 504, 1962
18. Bumpus, F.M., H.Schwarz, and I.H.Page:
Synthesis and Pharmacology of the Octapeptide Angiotonin
Science 125, 886, 1957
19. Bumpus, F.M., R.R. Smeby, I.H.Page, and P.A. Khairallah:
Distribution and Metabolic Fate of Angiotensin II and Various Derivates
Canad. Med. Ass. J. 90, 190, 1964

20. Carretero, O., and F. Gross:
Renin Substrate in Plasma Under Various
Experimental Conditions in the Rat
Amer. J. Physiol. 213, 695, 1967
21. Chamberlain, M.J., N.I. Browse, D.G. Gibson, and J.A. Gleeson:
Angiotensin and Reno-Portal Anastomosis
Brit. Med. J. 2, 1907, 1964
22. De Champlain, J.:
Studies on Renin-Angiotensin System in
Various Human Physiological and Pathological States
Ph. D. Thesis, McGill University 1965
23. Colowick, S.P.:
in: Methods in Enzymology (Hrsg. Colowick
und Kaplan) Academic Press Inc. Publishers,
New York. Band I, S. 98, 1955
24. Deane, H.W., and G.M.C. Masson:
Adrenal Cortical Changes in Rats with Various
Types of Experimental Hypertension
J. clin. Endocrin. 11, 193, 1951
25. Dexter, L.: The Hypertensinase Content of Plasma of Normal,
Hypertensive and Nephrectomized Dogs
Ann. Int. Med. 17, 447, 1942
26. Dixon, M., and Webb, E.C.:
Enzymes
Longmans 1966, S. 69
27. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, Basel
1955, S. 101
28. Doyle, A.E., and H. Blöck:
Reactivity to Pressor Agents in Hypertension
Circulation 12, 974, 1955
29. Doyle, A.E., W.J. Louis, and E.C. Osborn:
Plasma Angiotensinase Activity on Angiotensin II and Analogues
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 45, 41, 1967
30. Eigler, F.W., G. Heinecke, K.F. Albrecht, H. Marquardt und D. Sologuren:
Ergebnisse des Angiotensin-Infusionstests
beim Renovaskulären Hochdruck und anderen
Hypertonieformen
Klin. Wschr. 47, 354, 1969

31. Elliot, D.F., and W.S. Peart:
Amino-Acid Sequence in a Hypertensin
Nature 177, 527, 1956
32. Fasciolo, J.C., E. De Vito, J.C. Romero, and J.N. Cucchi:
The Renin Content of the Blood of Humans
and Dogs Under Several Conditions
Canad. med. Ass. J. 90, 206, 1964
33. Floyer, M.A.: The Effect of Nephrectomy and Adrenalectomy Upon the Blood Pressure in Hypertensive and Normotensive Rats
Clin. Sci. 10, 405, 1951
34. Fraser, R., V.H.T. James, J.J. Brown, P. Isaac, A.F. Lever, and J.I.S. Robertson:
Effect of Angiotensin and of Frusemide on Plasma Aldosterone, Corticosterone, Cortisol and Renin in Man
Lancet II, 989, 1965
35. Fregly, M.J.: Production of Hypertensin in Adrenalectomized Rats Given Hypertonic Salt Solutions to Drink
Endocrinology 66, 240, 1960
36. Genest, J., W. Nowaczynski, E. Koiw, P. Sandor, and P. Biron:
Adrenocortical Function in Essential Hypertension
in: Essential Hypertension ed. K.D. Bock and P.T. Cottier. Berlin 1960, S. 126
37. Glenner, G.G., P.J. McMillan, and J.E. Folk:
A Mammalian Peptidase Specific for the Hydrolysis of N-terminal L-Glutamyl and Aspartyl Residues
Nature 194, 867, 1962
38. Goldblatt, H., J. Lynch, R.F. Hanzal, and W.W. Summerville:
Studies on Experimental Hypertension: I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischaemia
J. exp. Med. 59, 347, 1934
39. Goldblatt, H.: Studies on Experimental Hypertension; Pathogenesis of Experimental Hypertension Due to Renal Ischaemia
Ann. Int. Med. 11, 69, 1937

40. Goldblatt, H.: Renal Origin of Hypertension
Physiol. Ref. 27, 120, 1947
41. Grollman, A., and T.R. Harrison:
Effect of Rigid Sodium Restriction on Blood
Pressure and Survival of Hypertensive Rats
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 60, 423, 1945
42. Gross, F. und P. Lichtlen:
Verstärkung der pressorischen Wirkung von
Renin, drucksteigernden Peptiden und adren-
ergischen Wirkstoffen nach Nephrektomie und
bei der Überdosierung von Cortexon
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharmac. 233, 323, 1958
43. Hartroft, P.M., L.E. Sutherland, and W.S. Hartroft:
Juxtaglomerular Cells as the Source of
Renin: Further Studies with the Fluorescent
Antibody Technique and the Effect of Pas-
sive Transfer of Antirenin
Canad. med. Ass. J. 90, 163, 1964
44. Hartroft, P.M., and W.S. Hartroft:
Studies on Renal Juxtaglomerular Cells I.
Variations Produced by Sodium Chloride, and
Desoxycorticosterone Acetate
J. exp. Med. 97, 415, 1953
45. Haynes, F.W., and L. Dexter:
Plasma Hypertensinase
J. clin. Invest. 24, 75, 1945
46. Helmer, O.M., and I.H. Page:
Purification and Some Properties of Renin
J. biol. Chem. 127, 757, 1939
47. Hickler, R.B., D.P. Lauler, and G.W. Thorn:
Plasma Angiotensinase Activity in Patients
with Hypertension and Edema
J. clin. Invest. 42, 635, 1963
48. Hodge, R.L., K.K.F. Ng, and J.R. Vane:
Disappearance of Angiotensin from the Circu-
lation of the Dog
Nature (London) 215, 138, 1967
49. Holley, K.E., J.C. Hunt, A.L. Brown, O.W. Kincaid, and
S.G. Sheps
Renal Artery Stenosis. A Clinical-Patholo-
gical Study in Normotensive and Hyperten-
sive Patients
Amer. J. Med. 37, 14, 1964

50. Itskovitz, H.D., and L.D. Miller:
Renal Angiotensinase Activity
Circ. Res. 19, 507, 1966
51. Itskovitz, H.D., S.J. Dudruck, I. Dyrdá, and J.J. Murphy:
Plasma Angiotensinase Activity in Hypertensive Patients
Arch. intern. Med. 119, 241, 1967
52. Itskovitz, H.D., L. Miller, W. Ural, J. Zapp, and R. White:
Inactivation of Angiotensin in Shock
Amer. J. Physiol. 216 (1), 5, 1969
53. Johnston, C.J., and A.D. Jose:
Reduced Vascular Response to Angiotensin II in Secondary Hyperaldosteronism
J. clin. Invest. 42, 1411, 1963
54. Kaplan, N.M., and J.G. Silah:
The Effect of Angiotensin II on the Blood Pressure in Humans with Hypertensive Disease
J. clin. Invest. 43, 659, 1964
55. Katz, J.I., J.H. Skom, and G.E. Wakerlin:
Pathogenesis of Spontaneous and Pyelonephritic Hypertension in Dog
Circ. Res. 5, 137, 1957
56. Khairallah, P.A., F.M. Bumpus, I.H. Page, and R.R. Smeby:
Angiotensinase with a High Degree of Specificity in Plasma and Red Cells
Science 140, 672, 1963
57. Khairallah, P.A., I.H. Page, F.M. Bumpus, and R.K. Türker:
Angiotensin Tachyphylaxis and its Reversal
Circ. Res. 14, 247, 1966
58. Khairallah, P.A., and I.H. Page:
Plasma Angiotensinases
Biochem. Med. 1, 1, 1967
59. Klaus, D., H. Kaffarnik und H. Pfeil:
Untersuchungen über die Serum-Angiotensinase I und II
Klin. Wschr. 41, 376 und 380, 1963
60. Klaus, D., and P. Biron:
Electrophoretic Behaviour of Serum Angiotensinase
Nature 204, 381, 1964

61. Klaus, D., A. Heizmann und H. Uehlecke:
Beeinflussung der Blutdruckwirkung von
Angiotensin durch Aminopeptidase und Carb-
oxypeptidase
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharmac. 251, 28, 1965
62. Klaus, D.: Vergleichende Untersuchungen über die Blut-
druckwirkung von α -und β -Angiotensin II bei
intravenöser Infusion
Klin. Wschr. 44, 1044, 1966
63. Klaus, D., A. Heizmann und P. Sadowski:
Ergebnisse von Bestimmungen des Plasma-
Renins
Dtsch. med. Wschr. 92, 2114, 1967
64. Kokubu, T., E. Ueda, S. Fujimoto, K. Hiwada, H. Sanga,
and Y. Yamamura:
Plasma Angiotensinase Activity in Liver
Disease
Clin. chim. Acta 12, 484, 1965
65. Kokubu, T., E. Ueda, S. Fujimoto, K. Hiwada, H. Sanga, and
Y. Yamamura:
Angiotensinase in Red Cells
Clin. chim Acta 13, 13, 1966
66. Kokubu, T., S. Fujimoto, K. Hiwada, H. Akutsu, A. Kato, and
Y. Yamamura:
Inactivation of Angiotensin II in Liver
Jap. Circul. J. 31, 879, 1967
67. Koletsky, S., J. M. Rivera-Velez, D. G. Marsh, and W. H.
Pritchard:
Relation of Renal Arterial Pressure to Acti-
vity of Renin-Angiotensin System in Renal
Hypertension
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 125, 96, 1967
68. Laragh, J. H., S. Ulick, V. Jauszewicz, Q. B. Demling,
W. G. Kelly, and S. Lieberman:
Aldosterone Secretion and Primary and Ma-
lignant Hypertension
J. clin. Invest. 39, 1091, 1960
69. Laragh, J. H.: Interrelationship between Angiotensin,
Norepinephrine, Aldosterone Secretion and
Electrolyte Metabolism in Man
Circulation 25, 203, 1962

70. Lewis, G.P., and E. Reit:
The Action of Angiotensin and Bradykinin
on the Superior Cervical Ganglion of the
Cat
J. Physiol. 179, 538, 1965
71. Louis, W.J., and A.E. Doyle:
The Effects of Varying Doses of Angioten-
sin on Renal Function and Blood Pressure
in Man and Dogs
Clin. Sci. 29, 489, 1965
72. Lubash, G.D., E.C. Hammel, and R.J. Mearles:
Serum Angiotensinase Activity in Hyper-
tension
Clin. chim. Acta 18, 439, 1967
73. Lubash, G.D., E.C. Hammel, and R.J. Mearles:
Serum Angiotensinase Activity in Cirrhosis
Amer. J. med. Sci. 255, 105, 1968
74. Lubash, G.D., R.H. Bard, and J.A. Kline:
Serum "Angiotensinase Activity" and Female
Steroidal Hormones
Amer. J. med. Sci. 257, 155, 1969
75. Meister, A.: in: Methods of Enzymology (Hrsg: Colowick
und Kaplan) Academic Press Inc. Publishers,
New York. Band II, S. 383, 1955
76. Method, A.L., P. Meyer, P. Biron, M.F. Lorain, G. Lagrue,
and P. Milliez:
Hepatic Inactivation of Angiotensin
Nature 203, 531, 1964
77. Morandini, G., and C. Mangioni:
Studies on Plasma Angiotensinase Activity
in Normal and Toxemic Pregnancy
Acta med. Scand. 185, 311, 1969
78. Nagutsu, I., L. Gillespie, J.E. Folk, and G.G. Glenner:
Serum Amino-peptidases, "Angiotensinase",
and Hypertension I, II.
Biochem. Pharmacol. 14, 721 und 853, 1965
79. Nicotero, J.A., S.E. Moutsos, E. Perez-Stable, H.E. Tur-
rian, and A.P. Shapiro:
Diagnostic and Physiologic Implications of
the Angiotensin Infusion Test
New Engl. J. Med. 274, 1464, 1966

80. Oelkers, W., H.J. Langholz und I.U.v. Goldacker:
Beziehungen zwischen der Blutdruckwirkung
von Angiotensin II und dem arteriellen Mit-
teldruck, Serumnatrium, Serumkalium, Serum-
angiotensinase und Plasma-Renin beim Men-
schen
Zeitschr. f. Kreislaufforschg. 5, 437, 1968
81. Osborn, E.C., W.J. Louis, and A.E. Doyle:
Preparation, Isolation and Properties of
³⁵S Phenylthiocarbamyl-Angiotensin II
Austr. J. exp. Biol. 44, 41, 1966
82. Osborn, E.C., G. Jerums, and B.A. Jupp:
Blood Angiotensinase Activity in Relation
to the Breakdown of Angiotensin II Amide
and Non-Isotopic Phenylthiocarbamyl-Angio-
tensin II Amide in Hypertensive and Normo-
tensive Patients
Cardiovasc. Res. 2, 33, 1968
83. Page, E.W.: Plasma Angiotensinase in Normal and Toxemic
Pregnancies
Amer. J. med. Sci. 213, 715, 1947
84. Page, I.H.: Effect of Bilateral Adrenalectomie on Arte-
rial Blood Pressure of Dogs with Experimen-
tal Hypertension
Amer. J. Physiol. 122, 352, 1938
85. Page, I.H., B. McSwain, G.M. Knapp, and W.D. Andrus:
The Origin of Renin-Activator
Amer. J. Physiol. 135, 214, 1941
86. Peart, W.S.: Hypertension and the Kidney
Brit. med. J. 2, 1353 und 1421, 1959
87. Pfeleiderer, G.: in: Methoden der enzymatischen Analyse
(Hrsg. H.U. Bergemeyer) Verlag Chemie GmbH
Weinheim, Bergstraße 1962, S. 381
88. Pickens, P.T., F.M. Bumpus, A.M. Lloyd, R.R. Smeby, and
I.H. Page:
Measurement of Renin Activity in Human
Plasma
Circ. Res. 17, 438, 1965
89. Pickering, G.W., and W. Prinzmetal:
Some Observations on Renin, a Pressor Sub-
stance Contained in the Normal Kidney,
together with a Method of its Biological
Assay
Clin. Sci. 3, 211, 1938

90. Flentl, A.A., I.H. Page, and W.W. Davis:
The Nature of Renin Activator
J. biol. Chem. 147, 143, 1943
91. Regoli, D., B. Riniker, and H. Brunner:
The Enzymatic Degradation of Various Angiotensin II Derivates by Serum, Plasma or Kidney Homogenate
Biochem. Pharm. 12, 637, 1963
92. Reid, W.D., and J.H. Laragh:
Sodium and Potassium Intake, Blood Pressure, and Pressure Response to Angiotensin
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 120, 26, 1965
93. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry
Pergamon Press, London/New York 1961
94. Riniker, B. und R. Schwyzer:
Die sterische Einheitlichkeit des synthetischen Val²-Hypertensin II-Asp¹- β -amids
Helvet. chim. Acta 44, 658, 1961
95. Riniker, B.: Recent Work on the Chemistry and Biochemistry of Angiotensin II
Metabolism 13, 1247, 1964
96. Ripa, A., P. Gilli, R. Meo, and A. Buzzoni:
L' angiotensinemia venosa nella gravidanza
Arch. Ostetr. Ginec. 71, 143, 1966
97. Rittel, W., B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker und R. Schwyzer:
Synthese eines hochwirksamen Hypertensin-II-amids (L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-histidyll-L-propyll-L-phenylalanin)
Helvet. chim. Acta 40, 614, 1957
98. Rosemann, R.H., S.C. Freed, and M. Friedmann:
The Peripheral Vascular Reactivity of Potassium-Deficient Rats
Circulation 2, 412, 1952
99. Sambhi, P.M., B.A. Lewthman, J.C. Beck, and E.H. Venning:
The Rate of Aldosterone Secretion in Hypertensive Patients with Demonstrable Renal Artery Stenosis
Metabolism 12, 498, 1963

100. Sambhi, M.P., and J.D. Barrett:
Angiotensinase Activity in Fractionated
Human Plasma and Effect of Enzyme Inhibitors
Clin. Res. 14, 149, 1966
101. Schwyzer, R., B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel und H. Zuber:
Synthese hochwirksamer Dekapeptide mit der
Aminosäuresequenz des Val⁵-Hypertensins I
(L-Asparagyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-
L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-
L-histidyl-L-leucin und L-Asparaginyll-L-
arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-
-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin)
Helvet. chim. Acta 41, 1273, 1958
102. Skeggs, L.T., W.H. Marsh, J.R. Kahn, and N.P. Shumway:
The Existence of Two Forms of Hypertensin
J. exp. Med. 99, 275, 1954
103. Skeggs, L.T., J.R. Kahn, and N.P. Shumway:
The Preparation and Function of the Hyper-
tensin Converting Enzyme
J. exp. Med. 103, 295, 1956
104. Smith, H.W.: Unilateral Nephrectomy in Hypertensive
Disease
J. Urol. (Baltimore) 76, 685, 1956
105. Smith, E.E., E.P. Pineda, and A.M. Ruthenberg:
Localization of Serum Leucine Aminopeptidase
Activity by Paper Electrophoresis
Proc. Soc. exp. Biol. 110, 683, 1962
106. Smith, E.E., and A.M. Ruthenberg:
Electrophoretic Behaviour of an Aminopepti-
dase of Human Tissues and Serum
Nature 197, 800, 1963
107. Tigerstedt, R. und P.G. Bergman:
Niere und Kreislauf
Skand. Arch. Physiol. 8, 223, 1898
108. Tobian, L., J. Thompson, R. Twedt, and J. Janacek:
Granulation of Juxtaglomerular Cells in Renal
Hypertension, Desoxycorticosterone and Post-
desoxycorticosterone Hypertension, Adrenal
Regeneration Hypertension, and Adrenal In-
sufficiency
J. clin. Invest. 37, 660, 1958

109. Tobian, L.: Interrelationship of Electrolytes, Juxtaglomerular Cells, and Hypertension
Physiol. Rev. 40, 280, 1960
110. Vander, A.J., and R. Miller:
Control of Renin Secretion in the Anesthetized Dog
Amer. J. Physiol. 207, 537, 1964
111. Vander, A.J.: Control of Renin Release
Physiol. Rev. 47, 359, 1967
112. Vorherr, H., A. Dimitrow und J. Hüter:
Untersuchungen über den Abbau von Hypertensin durch Blutplasma von nichtschwangeren und schwangeren Frauen
Klin. Wschr. 43, 614, 1965
113. Wakerlin, G.E., and C.A. Johnson:
Reductions in Blood Pressure of Renal Hypertensive Dogs by Hog Renin
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 46, 104, 1941
114. Wakerlin, G.E., J. Marshall, and H. Minatoya:
in: Zweifach, B.W. and E. Schorr:
Factors Regulating Blood Pressure
N.Y. 1948, S. 61
115. Weidmann, P. und W. Siegenthaler:
Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bei hypertensiven Zuständen
Dtsch. med. Wschr. 92, 1953, 1967
116. Wernze, H. und J. Fujii:
Hepatische Inaktivierung und vasopressorische Wirkung von Angiotensin
Zeitschr. ges. exp. Med. 140, 128, 1966
117. Wilson, C.: Experimental Observations on the Role of the Kidney in the Etiology of Hypertension
Amer. J. Cardiol., May 1962, S. 685
118. Wolf, R.L., M. Mendlowitz, S.E. Gitlow, and N. Naftchi:
Metabolism of Angiotensin II- J^{131} in Normotensive and Hypertensive Human Subjects
Circulation 23, 754, 1961
119. Wolf, R.L., M. Mendlowitz, J. Pick, S.E. Gitlow, and N. Naftchi:
In Vitro Degradation of J^{131} Labelled Angiotensin II by Normotensive and Hypertensive Human Serum
Proc. Soc. exp. Biol. 109, 308, 1962

120. Wood, J.E.: Genetic Control of Neutralization of Angiotensin and its Relationship to Essential Hypertension
Circulation 25, 225, 1962

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AT II = α -L-Asp¹-Angiotensin II (natürliches Angiotensin II)
 AT II-Amid = α -L-Asp¹-NH₂-Angiotensin II (synthetisches Angiotensin II)

ATase = Angiotensinase

ANA = α -L-Aspartyl- β -naphthylamid

CBP = Carboxypeptidase

LAP = Leucinaminopeptidase

LNA = α -L-Leucyl- β -naphthylamid

A. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM

I. Renin

Im Jahre 1898 extrahierten Tigerstedt und Bergman (107) aus der Kaninchen-Niere eine Substanz, die nach intravenöser Injektion bei Tieren einen länger dauernden Blutdruck-Anstieg hervorrief. Die Autoren bezeichneten die Substanz als 'Renin'. Das gleiche Phänomen beobachteten 1938 Pickering und Prinzmetal (89), die gleichzeitig einen biologischen Test zur Messung des Renin angaben. Es wurde zunächst vermutet, daß das Renin direkt für die Blutdruck-Steigerung verantwortlich sei.

Dann fanden Helmer und Page (46) 1939, daß gereinigtes Renin am isolierten, mit Ringer-Lösung durchströmten Organ keine Erhöhung des Gefäßwiderstandes bewirkte. Erst nach Zugabe eines Eiweißextraktes aus Plasma und Erythrocyten trat eine Widerstandserhöhung ein. Plentl und Mitarbeiter (90) fanden, daß diese - zunächst als 'Reninaktivator' bezeichnete - Substanz das Renin-Substrat darstellt. Erst das Produkt der Renin-Substrat-Reaktion zeigte den pressorischen Effekt. Es erhielt die Bezeichnung 'Angiotonin'. Die Autoren identifizierten das Renin-Substrat, 'Angiotensinogen', als Plasma-Protein der α_2 -Globulinfraktion.

Bildungsort des Renin sind mit größter Wahrscheinlichkeit die 'Myoepithelien' der juxtaglomerulären Zellen an den Gefäßpolen in der Niere (43). Durch besondere Präparation lassen sich in diesen Zellen Granula darstellen, deren Anzahl sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen wie die Menge des aus der Niere extrahierbaren Renin verhält: Beide Parameter nehmen proportional zu oder ab (109). Ein weiterer Hinweis dafür, daß das Renin in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet wird, liegt in der spezifischen Reaktion dieser Zellen mit Fluorescein-markiertem Anti-Renin (43).

Der adäquate Sekretionsreiz für das Renin ist noch nicht genau bekannt. Nach Konstriktion einer Nierenarterie steigt der extrahierbare Reningehalt der ischämischen Niere an (114). Der Granula-Gehalt in den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriolen nimmt zu (108). Unter den gleichen Versuchsbedingungen wird jedoch eine Verminderung der Renin-Sekretion auf den Ausgangswert durch eine medikamentös ausgelöste Diurese beobachtet (110). Vander und Miller (110) wiesen auch nach, daß unter verschiedenen Versuchsbedingungen die Veränderungen der Renin-Aktivität und der Natrium-Exkretion immer in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis standen. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß bei der dosierten Konstriktion der Nierenarterie nicht der Druckabfall, sondern die Verminderung der Flüssigkeits- und bzw. oder der Natrium-Exkretion eine Steigerung der Renin-Sekretion bewirken. Möglicherweise dient die Macula densa als Rezeptor (111).

Biochemisch läßt sich das Renin als Protease charakterisieren. Die Methoden zur Bestimmung der Renin-Aktivität bestehen meist in biologischen Blutdruck-Tests an Tieren: Nach Inkubation von Renin mit Renin-Substrat wird das Reaktionsprodukt dem Versuchstier injiziert. Der Blutdruck-Anstieg wird mit dem eines Standardpräparates (Hypertensin Ciba) verglichen. - Die pharmakologischen Wirkungen sollen weiter unten beschrieben werden, da sie wahrscheinlich alle durch das AT II vermittelt werden.

II. Angiotensinogen und Angiotensin

Angiotensinogen, das Renin-Substrat, wird nach Page et al. (85) in der Leber produziert. Es läßt sich quantitativ bestimmen, indem ein geringes Volumen Plasma oder Gewebe mit einem Überschuß Renin inkubiert und das Reaktionsprodukt am biologischen Blutdruck-Test gemessen wird. Welche

Faktoren seine Plasma-Konzentration regulieren, kann nach den vorliegenden Befunden noch nicht mit Sicherheit bestimmt werden (20).

Das Angiotensinogen ist ein Glykoproteid mit einem Molekulargewicht von etwa 56 000. Es wird von Renin hydrolysiert. Dabei entsteht das Dekapeptid Angiotensin I, das keine vasopressorischen Eigenschaften besitzt. Seine Struktur und Aminosäuresequenz wurden 1955 von Skeggs und Mitarbeitern (102) (Pferde-Angiotensin I) und 1956 von Elliot und Peart (31) (Rinder-Angiotensin I) aufgeklärt. Das 'converting enzyme' (104) überführt durch Abspaltung des Dipeptids His-Leu vom Carboxylende das Dekapeptid in das vasopressorisch aktive Oktapeptid AT II. Diese Reaktion verläuft aufgrund der hohen Aktivität des converting enzyme so schnell, daß die Blutdruckwirkungen von in entsprechenden Dosen injiziertem AT I und AT II identisch sind.

Das Ileu⁵-AT II (Schweine- und Pferde-AT II) wurde 1957 von Bumpus und Mitarbeitern (18) synthetisiert. Die Arbeitsgruppe der Ciba (97) stellte das Amid dieser Substanz dar und synthetisierte das Val⁵-AT II (Rinder-AT II) (101), das dem menschlichen AT II entspricht.

Die Aminosäuresequenz des menschlichen AT II lautet:
 α -L-Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-COOH

Durch Versuche mit verschiedenen AT II-Analogen, die sich meist an ihrem Aminoende voneinander unterscheiden, wurden in den vergangenen Jahren wichtige Erkenntnisse über Biochemie und Pharmakologie des AT II und über die Eigenschaften des AT II-spaltenden Enzymsystems gewonnen. Besonders für die Erforschung des letzteren wurde meist das AT II-Amid (Hypertensin Ciba) verwandt, da sich dieses wesentlich leichter synthetisieren läßt und als blutdrucksteigerndes Medikament im Handel ist. Sein pressorischer

Effekt ist sowohl qualitativ als auch quantitativ dem natürlichen AT II vergleichbar. - Das AT II läßt sich im zirkulierenden Blut des Menschen nachweisen. Die bisher bekannten Methoden sind jedoch ungenau und schlecht reproduzierbar.

Soweit bisher bekannt, werden alle physiologischen Wirkungen des Renin durch das AT II vermittelt. Die Erhöhung des Blutdrucks ist die am längsten und besten bekannte dieser Wirkungen. Daneben stimuliert es die glatte Muskulatur fast sämtlicher Organe in unterschiedlichem Ausmaß (12). Darüber hinaus ist eine stimulierende Wirkung des AT II auf die Adrenalin-Freisetzung aus der Nebenniere (9) und auf autonome Ganglienzellen (70) bekanntgeworden.

Außerdem wurden intrarenale Wirkungen des Renin diskutiert, vor allem solche auf die Blutverteilung in verschiedenen Bereichen des Nierenkreislaufs und dadurch - oder auch unabhängig davon über eine noch nicht näher bekannte Einwirkung auf die tubuläre Harnbereitung - auf Diurese und Anti-diurese. So ließen sich zum Beispiel beim Diabetes insipidus durch AT II-Infusionen ebenso wie durch ADH-Gaben eine Volumenverminderung und eine Osmolaritäts-Erhöhung des Urins erreichen (86).

Wichtiger ist die Entdeckung eines Zusammenhanges zwischen dem RAS und der Nebennierenrinde. 1951 fanden Deane und Masson (24), daß die Zufuhr von Renin bei Ratten eine erhöhte Aktivität in der aldosteronproduzierenden Zona glomerulosa der Nebennierenrinde auslöste. Zwei Jahre später zeigten Hartroft und Hartroft (44), daß bei Natrium-Mangel im juxtaglomerulären Apparat der Niere histologische Veränderungen entstanden, die für eine gesteigerte Renin-Bildung sprachen. Gegensätzliche Veränderungen wurden nach Natrium-Zufuhr im Überschuß gefunden. Die Infusion von AT II bewirkt bei Ratten (4), bei Menschen und Hunden (71) eine parallele Änderung des Glomerulum-Filtrats und der Natrium-

Exkretion, deren Richtung abhängig von der Dosis des AT II ist. Später beschrieben Genest und Mitarbeiter (36) eine erhöhte Aldosteron-Exkretion nach AT II-Infusion beim Menschen. Diese und andere Befunde legten die Vermutung nahe, daß das Renin bzw. AT II über eine Beeinflussung der Aldosteron-Sekretion an der Kontrolle des Natrium-Haushaltes beteiligt sind.

III. Angiotensinasen (Überblick)

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen wird das AT II in vivo vorwiegend durch Aminopeptidasen, in geringerem Maß auch durch Endopeptidasen inaktiviert (91). Der geschwindigkeitslimitierende Faktor der AT II-Hydrolyse im Plasma ist offenbar eine substratspezifische Aminopeptidase (59,78,19,29). Untersuchungen von Nagatsu et al. (78) bestärken die schon früher geäußerte Vermutung, daß bei der Inaktivierung von AT II und AT II-Amid im Plasma unterschiedliche Enzyme beteiligt sind.

Der Ort der AT II-Inaktivierung ist noch nicht bekannt. Versuche von Brunner und Regoli (17) weisen darauf hin, daß der AT II-Abbau nicht nur im zirkulierenden Blut erfolgt.

Die bisher am häufigsten benutzte Methode zur quantitativen ATase-Bestimmung (Inkubation von AT II in einer weit unter Substrat-Sättigung liegenden Konzentration mit Plasma und Vergleich des Blutdruck-Effekts vor und nach der Inkubation) läßt keine Aussage über die absolute Enzymaktivität zu. Eine exakte, wenn auch sehr aufwendige (papierchromatographische) Methode wurde erst 1963 von Klaus und Mitarbeitern (59) angegeben. - Die Forschungsergebnisse über die AT II-Inaktivierung sollen unter B. eingehender beschrieben werden.

IV. Das Renin-Angiotensin-System und der renale Hypertonus

1934 gelang Goldblatt und Mitarbeitern (38) die Erzeugung eines systolischen und diastolischen Hypertonus am Hund durch partielle Konstriktion beider Nierenarterien. Bei anderen Versuchstieren (z.B. Ratten) genügte die Drosselung einer Nierenarterie, um einen dauernden Hochdruck zu bewirken (40). Nach Entfernung der ischämischen Niere normalisierte sich der Blutdruck innerhalb kurzer Zeit, ebenso nach Beseitigung der Arterienkonstriktion. Später fand Floyer (33), daß ein über längere Zeit bestehender "Goldblatt-Hypertonus" am Tier durch Entfernung der ischämischen Niere nicht mehr beseitigt werden konnte. Diese und andere Befunde führten zu intensiven Untersuchungen über das Problem des Zusammenhanges zwischen Nierenerkrankung und Hypertonie. Die Ergebnisse sind z.T. widersprüchlich, und es herrscht noch immer keine Klarheit über den zugrunde liegenden Mechanismus.

Es war naheliegend, das RAS als ursächlichen Faktor für die renale Hypertonie anzunehmen (9). Die Normalisierung eines chronischen Hypertonus beim Hund durch Injektion von Anti-Renin, das mit dem endogenen Renin kreuzreagierte (113), stützte diese Annahme besonders. Bei hämodynamisch wirksamer Nierenarterienstenose führte eine Operation nur in einem Teil der Fälle zu einer Blutdruck-Senkung oder gar -Normalisierung (104). Auf der anderen Seite wurden bei Normotonikern hämodynamisch wirksame Nierenarterienstenosen gefunden (49). Durch Renin- bzw. AT II-Bestimmungen hoffte man, blutdrucksteigernde Nierenarterienstenosen von pressorisch unwirksamen unterscheiden zu können.

Mit der Entwicklung von ausreichend exakten Methoden zur Renin-Bestimmung wurde diese Hoffnung enttäuscht. Bei Patienten mit gesichertem renalen Hochdruck wurden Renin-

Werte von der unteren Grenze bis zum Hundertfachen der Norm gemessen (16). Aus den bisherigen Forschungsergebnissen läßt sich die Vermutung ableiten, daß eine gesteigerte Renin-Aktivität für die Frühphase eines durch Nierenischämie hervorgerufenen Hochdrucks verantwortlich sein könnte, während einem chronischen Hypertonus andere Mechanismen zugrunde liegen müssen (117, 67).

An der Aufrechterhaltung eines normalen Blutdrucks scheint das RAS hauptsächlich durch Regulierung des Natrium-Haushalts über die Nebennierenrinde beteiligt zu sein, kaum durch seine direkte vasopressorische Wirkung. Folgende Befunde stützen diese Annahme: Bei gesunden Hunden hat die aktive Immunisierung mit Schweine-Renin keinen Einfluß auf den Blutdruck (55). Durch erhöhte Salzzufuhr läßt sich beim Menschen die Renin-Sekretion vermindern und umgekehrt durch Salzentzug steigern (13), wobei keine signifikanten Blutdruckschwankungen zu beobachten sind. Durch AT II-Infusion wird die Aldosteron-Sekretion stimuliert (34). Auf der anderen Seite wurde festgestellt, daß die pressorische Wirkung von Renin bzw. AT II abhängig ist vom Salzhaushalt des Körpers. Sie ist z.B. abgeschwächt bei Patienten, die an Störungen des Mineralhaushalts leiden (besonders beim sog. "Bartter-Syndrom" und bei Lebercirrhose und Ascites) und die extrem hohe Plasma-Renin-Konzentrationen aufweisen (1, 5).

Ist eine direkte vasopressorische Wirkung des Renin, wenn überhaupt, nur für die Frühphase eines renovasculären Hochdrucks anzunehmen, so scheint seine Stimulierung der Nebennierenrinde bei vielen Hochdruckformen von Bedeutung zu sein. Eine Nierenarterien-Konstriktion am adrenalectomierten Tier bewirkt nur dann einen Hypertonus, wenn zusätzlich Nebennierenrindenextrakte und Kochsalz verabreicht werden (39, 84). Auch durch Zufuhr großer Kochsalzmengen

kann dieser Effekt erreicht werden (35), während ein experimenteller renaler Hochdruck durch Natrium-Restriktion gesenkt werden kann (41).

Dauernde Zufuhr größerer Aldosteron-Mengen führt beim Menschen zu einem Hypertonus, wenn gleichzeitig Kochsalz zugeführt wird (3). Eine erhöhte Aldosteron-Sekretionsrate wurde in fast allen untersuchten Fällen eines schweren, progredienten Hypertonus gemessen (68). Sambhi et al. (99) dagegen fanden bei Patienten mit gesicherter Nierenarterienstenose und benigner Verlaufsform normale Aldosteron-Werte. Möglicherweise entscheidet das Ausmaß der Störung im Mineralhaushalt über die Schwere der Kreislaufkrankung.

B. METHODEN UND ERGEBNISSE DER ANGIOTENSINASEN-FORSCHUNG

I. Methoden

Die ersten Untersuchungen über die ATasen-Aktivität stammen von Dexter und Haynes aus dem Jahre 1942 bzw. 1945 (25,45) und von Braun-Menéndez aus dem Jahr 1946 (11). Sie stellten durch Inkubation von Renin mit Renin-Substrat ein AT II-Präparat her, das allerdings sehr unrein war. Als Maß der ATase-Aktivität benutzten sie die Differenz zwischen dem durch AT II-Injektion bewirkten Blutdruckanstieg am Tier vor und nach Inkubation des AT II mit dem zu untersuchenden Blut oder Plasma. Mit der Synthese des AT II und der kommerziellen Herstellung des AT II-Amid wurden Versuche über die Inaktivierung dieser Substanz in größerem Umfang möglich. Die Mehrzahl der Untersucher verfuhr weiter nach dem Prinzip der Dexter'schen Methode: Inkubation einer Standard-Lösung von AT II-Amid mit dem enzymhaltigen Material und Vergleich ihres Blutdruckeffektes vor und nach der Inkubation. Meist wurde der Druck blutig an nephrektomierten Ratten, Hunden oder Katzen gemessen. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine Reihe von Informationen über den AT II-Abbau erarbeitet.

Bei allen beschriebenen Versuchen blieben jedoch enzymologisch wichtige Daten wie pH-Optimum und Substrat-Sättigung unberücksichtigt. Dies mag einer der Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse insbesondere der klinischen Untersuchungen sein. 1963 entwickelten Klaus und Mitarbeiter (59) eine Methode zur Bestimmung der ATase-Aktivität unter chemisch besser definierten Bedingungen. Nach Inkubation von Serum mit einem Überschuß AT II-Amid trennten sie die gebildeten Aminosäuren papierchromatographisch auf und werteten die mit Ninhydrin angefärbte Val-Bande densitometrisch aus. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in dem

dazu erforderlichen weitgehenden AT II-Abbau zur Freisetzung beider Val^{3,5}-Moleküle. Diese ist bei der biologischen AT II-Inaktivierung nicht nötig, da bereits das Hexapeptid kaum noch pressorisch wirksam ist.

Die Arbeitsgruppe der Ciba-Forschungslaboratorien (91,94) hatte schon vorher über erste qualitative und halbquantitative papierchromatographische Studien zur Inaktivierung von AT II und seinen Analogen berichtet. Nagutsu et al. (78) stellten 1965 durch papierchromatographische Untersuchungen Unterschiede zwischen der enzymatischen Hydrolyse von natürlichem AT II und AT II-Amid fest. Dagegen ist die Abspaltung der Asparaginsäure aus dem natürlichen AT II nach den Befunden dieser Autoren offenbar identisch mit der aus dem Dipeptid α -L-Aspartyl- β -Naphthylamid (ANA). Auf die diesbezüglichen Versuche wird weiter unten näher eingegangen. Nagutsu und Mitarbeiter (78) entwickelten daraufhin einen Test zur Bestimmung der ATase-Aktivität im Serum, in dem sie statt des bisher verwandten AT II-Amid das ANA als Substrat einsetzten. Das Spaltprodukt β -Naphthylamid bestimmten sie colorimetrisch. - Es wurden auch radioaktive (81), fluoresceinmarkierte (29) oder - zum Studium des Wirkungsortes der ATase - AT II-Derivate mit hohem Molekulargewicht, z.B. N-(Poly-O-Acetylseryl)-Isoleucyl-AT II (2), als Substrate verwandt. 1961 versuchten Wolf et al. (118), die Enzymaktivität mit ¹³¹J-markiertem AT II als Substrat zu messen (Trennung der Abbauprodukte mit Hilfe der Radioelektrophorese). Hiergegen ist einzuwenden, daß mit dieser Methode die Aktivität nicht nur der ATase, sondern auch einer Dejodase bestimmt wird.

II. Ergebnisse früherer Untersuchungen

Identifizierung der am AT II-Abbau beteiligten Enzyme:
 Unter ATasen werden im Schrifttum alle Peptidasen^{verstanden}, die in vivo und in vitro das AT II und verschiedene Analoge, vor allem das AT II-Amid, spalten. - Das AT II ist ein Okta-peptid. Prinzipiell kann es von Amino-, Carboxy- und Endo-peptidasen hydrolysiert werden. Die Untersuchungen darüber, ob es sich beim Abbau des AT II um ein spezifisches oder mehrere unspezifische Enzyme handelt und welche Rolle sie bei der Blutdruckregulation spielen, haben zunächst widersprüchliche Ergebnisse gebracht. Allmählich zeigen sich jedoch Ansätze einer Klärung.

1962 wiesen Brunner und Regoli (17) eine unterschiedliche Blutdruckwirkung verschiedener AT II-Analoger nach, die sich nur durch die N-terminale Aminosäure voneinander unterscheiden. Sie vermuteten deshalb, daß eine Aminopeptidase an der Inaktivierung des AT II beteiligt sei. Khairallah et al. (56) kamen 1963 zu dem gleichen Ergebnis. Sie nannten das Enzym 'Angiotensinase A'.

Klaus et al. (59) zeigten 1963 mit Hilfe papierchromatographischer Untersuchungen, daß die zuerst erscheinenden Spaltprodukte des AT II-Amid die am N-terminalen Ende stehenden Aminosäuren bzw. Amide Arg und Asp-NH₂ sind. Sie wiesen außerdem nach, daß die Aufspaltung des Hepta- bzw. Hexapeptids schneller erfolgt als die des Oktapeptids, d.h. daß die Abtrennung des Asparagin der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Inaktivierung des AT II-Amid ist. Dieser Befund wurde wiederholt bestätigt, etwa von Nagatsu et al. (78), Bumpus et al. (19) und Doyle et al. (29).

Die Beteiligung einer Carboxypeptidase (CBP) beim AT II-Abbau wurde von mehreren Untersuchern ausgeschlossen. CBP konnte im Serum mit N-Hippuryl-L-Phenylalanin als Substrat nicht nachgewiesen werden (59). Die Arbeitsgruppe der Ciba

(91) suchte vergebens nach dem entsprechenden Spaltprodukt, dem Heptapeptid mit den Aminosäuren 1-7. Klassische CBP-Hemmer wie β -Phenyl-Propionsäure (59) und Mercaptoaethanol (100) haben keinen Einfluß auf die AT II-Inaktivierung.

Eine chymotrypsinartig wirkende Endopeptidase wurde von Regoli et al. (91) identifiziert. Ihre Aktivität ist unabhängig von Veränderungen des Substrats am Aminoende. Sie spaltet das AT II-Amid-Molekül in zwei Tetrapeptide, ist jedoch unter physiologischen Bedingungen von geringerer Aktivität als die Aminopeptidase. Diese ist also für die Inaktivierung des AT II geschwindigkeitsbestimmend. Im Ratten Serum fanden Regoli und Mitarbeiter (91) ein Verhältnis von Amino- zu Endopeptidaseaktivität wie 90 : 10, in Ratten nieren-Homogenat und menschlichem Plasma etwa wie 60 : 40; die Versuchsanordnung erlaubte jedoch nur eine grobe Abschätzung der Aktivitätsverhältnisse. Eine chymotrypsinartige ATase fanden auch Pickens et al. (88) und Doyle et al. (29) im menschlichen Plasma.

In vitro kann das AT II auch von anderen Endopeptidasen, etwa Trypsin, hydrolysiert werden. Nagutsu et al. (78) fanden jedoch keine Trypsin-Aktivität im Serum. Khairallah und Mitarbeiter (56) weisen jedoch darauf hin, daß evtl. bei bestimmten Krankheitszuständen, besonders, wenn sie mit Gewebeerstörung einhergehen, solche Enzyme ins Blut gelangen und bei der AT II-Inaktivierung eine Rolle spielen könnten.

Schwieriger ist die Abgrenzung der ATase von der Leucinaminopeptidase (LAP), da diese beiden Enzyme in ihrer biologischen Wirkungsweise ähnlich sind. Riniker und Schwyzer (94) zeigten 1961, daß AT II-Amid in vitro von der LAP schrittweise vom Aminoende bis zum Tripeptid His-Pro-Phe gespalten wird, Regoli et al. (91) wiesen 1963 auf die unterschiedlich schnelle Inaktivierung von AT II und AT II-Amid durch LAP hin: Nach 24 Stunden Inkubation waren 90 % des Amids gespalten, von AT II nur Spuren. Sie schlossen

daraus, daß die LAP nicht das einzige beteiligte Enzym bei der biologischen Inaktivierung des AT II sein kann, die, gemessen an der Dauer der Blutdruckwirkung, bei beiden Substraten fast gleich schnell erfolgt. Khairallah et al. (56) zeigten 1963, daß die Substanz α -L-Arg¹-AT II zwar von der LAP schnell inaktiviert, von der ATase-haltigen Plasmafraktion (35-50 % Ammonsulphatsättigung) jedoch nicht angegriffen wird. Klaus et al. (59) wiesen biochemische Unterschiede zwischen LAP und AT II-Amid-spaltendem Enzym nach: LAP wird im Gegensatz zur ATase durch Co⁺⁺ aktiviert. Nach Khairallah et al. (56) benötigt die LAP im Unterschied zur 'ATase A' Mg⁺⁺ als Cofaktor. Auch Koku-bu et al. (65) konnten zeigen, daß mit Hilfe von Stärkegel-Elektrophorese getrennte ATase-haltige Fraktionen keine LAP-Aktivität enthielten. - Alle diese Befunde lassen mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß es eine von der LAP verschiedene ATase-Aktivität im Plasma gibt. Allerdings kann eine Beteiligung der LAP zumindest beim Abbau des AT II-Amid im Plasma nicht ausgeschlossen werden (103).

Was von Regoli und Mitarbeitern (91) aufgrund der unterschiedlich schnellen biologischen Inaktivierung von AT II und AT II-Amid schon vermutet worden war, daß nämlich diese beiden Substrate von verschiedenen Enzymen hydrolysiert werden, wurde 1965 von Nagutsu et al. (78) bestätigt. Sie fanden, daß sich die Spaltung von α -L-Asp- β -Naphthylamid (ANA) im menschlichen Plasma nur durch AT II, nicht durch AT II-Amid kompetitiv hemmen läßt. Außerdem ist nach ihren Untersuchungen die Hydrolysegeschwindigkeit von Arg² nur beim AT II abhängig von der des Asp¹, nicht aber beim AT II-Amid. Schließlich läßt sich die Inaktivierung der beiden Substrate durch unterschiedliche Substanzen hemmen bzw. aktivieren. Das von Nagutsu et al. (78) beschriebene Enzym hat die gleichen biochemischen Eigenschaften wie die 1962 von Glenner und Mitarbeitern (37) beschriebene 'Aminopeptidase A' aus Ratten- und Schweinenieren mit einer Sub-

stratspezifität für Peptide mit freier Glutamin- bzw. Asparaginsäure am N-terminalen Ende. Das von Khairallah et al. (56) als 'ATase A' bezeichnete Enzym weicht in einigen Eigenschaften von dieser ab. Das scheint daran zu liegen, daß es sich hier um eine Mischung aus AT II-spaltendem und AT II-Amid-spaltendem Enzym handelt. In ihrer 1966 erschienenen Arbeit berichten Khairallah et al. (57) von Versuchen, die ebenfalls eine unterschiedliche Inaktivierung von AT II und AT II-Amid vermuten lassen: Die 'ATase A'-haltige Plasmafraktion hebt die Tachyphylaxie gegenüber beiden Substraten auf. Erhitzen der Plasmafraktion für 30 Minuten auf 60°C jedoch oder Schütteln mit Chloroform bewirkt eine Zerstörung des Enzyms, das die Tachyphylaxie gegenüber AT II aufhebt. Das Enzym mit der entsprechenden Wirkung auf AT II-Amid dagegen bleibt unverändert. Auch Sambhi und Barret (100) fanden 1966 unterschiedliche Hemm- und Aktivierungseigenschaften beim Abbau der beiden Substrate.

Angiotensinase-Aktivität in verschiedenen Geweben:

ATase-Aktivität wurde in verschiedenen Geweben nachgewiesen, so in Schweinenieren und -leber (59), in Rattennieren (59, 17,37,50) und in der menschlichen Darmwand (40). Auch in Urin und Galle fanden Klaus et al. (59) ATase-Aktivität. Auf Unterschiede der Inaktivierung von AT II durch Plasma bzw. Serum einer- und Nierengewebe andererseits weisen Brunner und Regoli (17) hin. Sie stellten unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten mehrerer AT II-Analoger durch Plasma und Nierenhomogenat fest. - In Rattennieren fanden Itskovitz und Miller (50) 90 % der gesamten ATase-Aktivität in den proximalen und distalen Tubuluszellen lokalisiert. - Erythrozyten-Hämolysat besitzt eine wesentlich höhere ATase-Aktivität als Plasma bzw. Serum (65), während intakte Erythrozyten keine Enzymaktivität aufweisen (45). Das zeigt die Notwendigkeit, bei ATase-Bestimmungen im Plasma oder Serum mit hämolysefreiem Material zu arbeiten. Khairallah

et al. (56) konnten keine Unterschiede der biochemischen Eigenschaften von Plasma- und Erythrozyten-ATase finden. Klaus und Mitarbeiter (59) weisen ebenfalls darauf hin, daß der Abbau von AT II-Amid durch Plasma und Erythrozyten in gleicher Weise erfolgt. Kokubu et al. (65) fanden bei Anwendung der Stärkegelelektrophorese, daß das AT II-Amid-spaltende Enzymsystem im Plasma ausschließlich mit den Albuminen und α_1 -Globulinen wandert. Die Erythrozyten-ATase dagegen hatte eine andere elektrophoretische Motilität. Eine Klärung dieses Befundes ist bisher nicht erfolgt.

Wirkungsort der ATase:

Über den Ort der AT II-Inaktivierung in vivo ist bisher kaum etwas bekannt. Doyle et al. (29) vermuten, daß der AT II-Abbau nur teilweise im zirkulierenden Blut erfolgt. Äquipressorische Dosen verschiedener AT II-Analoger zeigen in Form und Dauer ähnliche Blutdruckkurven, während sich bei den Abbauraten durch Plasma oder Blut in vitro erhebliche Unterschiede finden. So ist z.B. die Blutdruckwirkung von β -L-Asp-AT II nur wenig länger als die von AT II bzw. AT II-Amid, während es in vitro durch Plasma nur in Spuren abgebaut wird (17).

Klinische Untersuchungen:

Die klinischen Untersuchungen über die ATase-Aktivität im Serum bzw. Plasma von Patienten haben bisher widersprüchliche Ergebnisse gebracht. Die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet mit natürlichem AT II als Substrat berichten über gleiche Enzymaktivitäten bei Gesunden und Patienten mit Hochdruck, Leber- und Nierenkrankheiten (mit biologischer Methodik gemessen: 25,45). Wolf und Mitarbeiter (118) bestimmten die Halbwertszeit von mit ^{131}J markiertem AT II. Sie fanden sie zunächst verlängert bei Patienten mit essentieller Hypertonie. Bei in vitro-Versuchen mit dem gleichen Substrat stellten sie jedoch eine erhöhte Enzymaktivi-

tät im Serum Hochdruckkranker fest (119). Die von Wolf et al. verwandte Methode ist aber von zweifelhaftem Wert (s. B I.). Wood (120) fand durch Vergleich der blutdrucksteigernden Wirkung von AT II-Amid vor und nach Inkubation mit Patientenblut eine Verminderung der ATase-Aktivität im Plasma von Hochdruckkranken und deren Verwandten. Hickler et al. (47) berichten über erhöhte Enzymaktivitäten bei Patienten mit renalem Hypertonus. Sie benutzten den biologischen Blutdrucktest an der Ratte. Als Substrat verwendeten sie AT II-Amid. Sie faßten die Aktivitätszunahme der ATase als Folge einer Steigerung der Renin- bzw. AT II-Amid-Produktion im Sinne eines enzymatischen Adaptationsprozesses auf. Mit Hilfe der Bestimmung der ATase-Aktivität glaubten sie, ein relativ einfaches diagnostisches Hilfsmittel für den renalen Hypertonus gefunden zu haben. Diese Hypothese hat sich nicht bestätigen lassen. Spätere Untersuchungen über die ATase-Aktivität beim renalen Hypertonus ergaben normale Werte. Klaus et al. (59) arbeiteten zum ersten Mal mit einer enzymologisch exakteren Methode. Sie fanden keine signifikanten Unterschiede der Enzymaktivität bei Gesunden und Patienten mit essentiellem oder renalem Hochdruck. Aufgrund ihrer Befunde diskutieren die Autoren die Möglichkeit einer relativen Verminderung der ATase-Aktivität in den Fällen, in denen die AT II-Renin-Konzentration erhöht ist. - Normale Werte fanden auch Nagatsu et al. (78) bei Hypertonikern. Nur bei Hochdruckkranken mit sekundärem Aldosteronismus beobachteten sie eine Verminderung der ATase-Aktivität.

Bei hepatobiliären Erkrankungen ist nach Klaus et al. (59) die ATase-Aktivität signifikant erhöht. Die Autoren bringen diesen Befund in Zusammenhang mit dem bekannten Blutdruckabfall bei Leberkranken. Auch Biron et al. (7) und Kokubu et al. (64) fanden bei Lebercirrhose eine gesteigerte ATase-Aktivität. Kokubu et al. (64) berichten, daß bei Verwedendung von Stärkegelelektrophorese die ATase-Aktivi-

tät bei Gesunden nur in der Albumin-Fraktion, bei Leberkranken zusätzlich in der γ -Globulin-Fraktion zu finden sei. Klaus und Biron (60) bezweifelten die Existenz einer spezifischen ATase aufgrund der Tatsache, daß bei Hepatitis-Patienten mit einem signifikanten Anstieg der Serum-ATase-Aktivität auch ein vergleichbarer Aktivitätsanstieg aller anderen untersuchten Serum-Amino-peptidasen in der gleichen elektrophoretischen Eiweiß-Fraktion zu beobachten sei. Sie selbst stellten diese These jedoch wieder infrage in Zusammenhang mit ihren Untersuchungen über die ATase-Aktivität im Serum von Schwangeren. Hier fanden sie normale Werte, während alle anderen von ihnen untersuchten Amino-peptidasen deutlich erhöht waren (60). Eine normale ATase-Aktivität während der Gravidität wurde bereits vorher von Klaus et al. (59) gemessen und später von Vorherr et al. (112) bestätigt. Nagutsu und Mitarbeiter (78) berichten im Gegensatz dazu über einen signifikanten Anstieg der mit ihrer colorimetrischen Methode und ANA als Substrat gemessenen Enzymaktivität im letzten Drittel der Schwangerschaft.

C. FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT

1. Bis auf eine Ausnahme (59) waren die Methoden zur Messung der ATase-Aktivität bisher nicht exakt. Es wurde meist mit sehr kleiner Substratkonzentration gearbeitet, und das pH-Optimum der Reaktion wurde nicht berücksichtigt. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen ist anzunehmen, daß am Abbau des AT II in vivo mehr als ein Enzym beteiligt ist. Bei dem für die ATase-Bestimmung meist angewandten biologischen Blutdrucktest am Tier ist es nicht möglich, zwischen den Aktivitäten verschiedener Enzyme zu differenzieren. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, bei der nur der Schritt der AT II-Inaktivierung gemessen wird, der vermutlich im zirkulierenden Blut geschwindigkeitslimitierend für die Reaktion ist, nämlich die Abspaltung der Asparaginsäure bzw. des Asparagin vom AT II-Molekül.

2. Einige biochemische Daten der mit dieser Methode bestimmten Amino-peptidase (pH-Optimum, Michaeliskonstante) wurden erarbeitet. Erst unter Berücksichtigung dieser Daten konnten optimale Versuchsbedingungen für die beobachteten klinischen Untersuchungen über die ATase-Aktivität im Serum Kranker gefunden werden.

3. Die Infusion von AT II-Amid bei Gesunden und Patienten mit verschiedenen Erkrankungen kann einen unterschiedlichen Blutdruckeffekt haben. So ist die vasopressorische Wirkung von AT II bei Patienten mit essentieller Hypertonie in vielen Fällen erhöht (28,54), während sie im Vergleich dazu bei Patienten mit renovasculärer Hypertonie oft abgeschwächt ist (30,54,79). In Fällen von malignem Hypertonus wird sie regelmäßig erniedrigt gefunden (30,54,79). - Die vasopressorische Wirkung von AT II wird durch mehrere Parameter beeinflußt. Im Tierversuch sind dies u.a. Änderungen der K^+ - oder Na^+ -Bilanz (92), Nephrektomie (42) oder

Diuretikagabe (53). Auch eine geringere bzw. gesteigerte Angiotensin-Empfindlichkeit aufgrund einer erhöhten bzw. erniedrigten AT II-Freisetzung könnte als Ursache einer verminderten vasopressorischen Wirkung von infundiertem AT II-Amid infrage kommen (54).- Theoretisch ist es auch denkbar, daß die intravasale Inaktivierungsrate des infundierten AT II-Amid seinen Blutdruckeffekt beeinflußt, indem weniger AT II das Erfolgsorgan erreicht. Deshalb wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der ATase-Aktivität und der Blutdruckwirkung von infundiertem AT II-Amid bei Gesunden und Hypertonikern besteht.

4. Das natürliche AT II und das synthetische AT II-Amid werden, wie einige Autoren (78,91) vermuten, durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert. Zur Überprüfung dieser Annahme stand nur eine geringe Menge von natürlichem AT II zur Verfügung, so daß nur wenige Versuche durchgeführt werden konnten. Dabei wurde die mit AT II-Amid als Substrat entwickelte Methode für AT II überprüft. - Schließlich wurde die Stereospezifität des AT II-spaltenden Enzyms getestet.

5. In einer größeren klinischen Untersuchungsreihe wurde die Serum-ATase-Aktivität bei gesunden Versuchspersonen und Patienten mit Hypertonus und verschiedenen anderen Erkrankungen gemessen. Damit sollten die z.T. widersprüchlichen, meist mit Hilfe des biologischen Blutdrucktests gewonnenen Ergebnisse überprüft werden. Eine klinische Bedeutung kommt solchen Untersuchungen vermutlich nicht zu, solange nur AT II-Amid als Substrat zur Verfügung steht.

6. Es herrscht noch immer keine endgültige Klarheit darüber, ob ein spezifisches oder mehrere unspezifische Enzyme an der AT II-Inaktivierung beteiligt sind. Besonders die Rolle der LAP ist beim AT II-Abbau noch nicht geklärt. Parallelbestimmungen der LAP- und der ATase-Aktivität sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob die LAP unter Bedin-

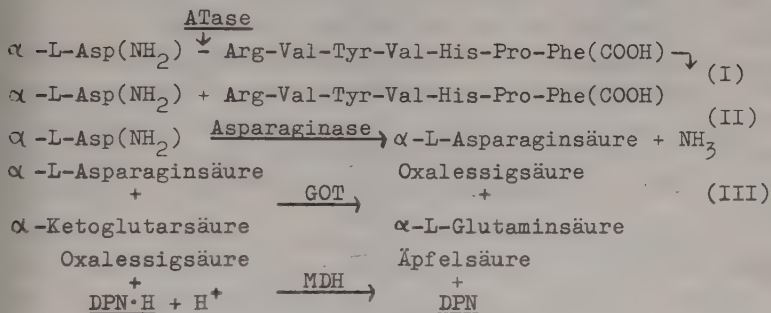
gungen wie Gravidität oder Lebererkrankung an der AT II-Hydrolyse beteiligt sein könnte.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der ATase-Aktivität im Serum

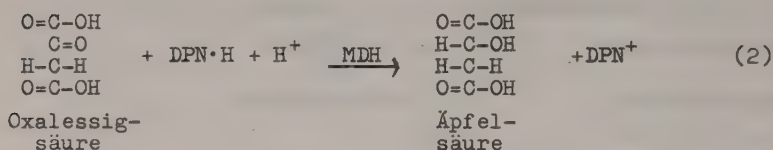
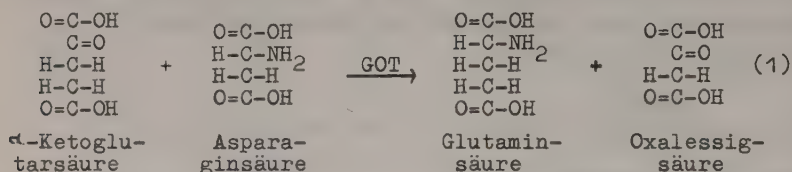
1. Prinzip der Methode

Schematisch läßt sich die Methode zur ATase-Bestimmung folgendermaßen wiedergeben:



Das zu testende Serum wird mit einem (vorher ermittelten) Substratüberschuß an AT II-Amid (Hypertensin Ciba) inkubiert. Substratkonzentration sowie Inkubationszeit und -temperatur werden konstant gehalten. Das zu bestimmende Enzym spaltet in diesem Ansatz eine von seiner Konzentration abhängige Menge Asparagin aus dem AT II-Amid-Molekül ab (Schritt I). Durch einen weiteren Inkubationsschritt mit aus Meerschweinchen-Plasma extrahierter Asparaginase in genügend hoher Konzentration wird das Asparagin vollständig in Asparaginsäure überführt (Schritt II). Dieser Zwischenschritt ist notwendig, da es keine einfache Methode zur direkten quantitativen Bestimmung des Asparagin gibt. Die quantitative Messung der gebildeten Asparagin-

säure erfolgt anschließend mit Hilfe eines DPN·H-abhängigen optischen Tests (Schritt III). Dabei wird die von Pfeleiderer nach Warburg angegebene Methode (87) in leicht abgewandelter Form benutzt: Statt 0,1 ml werden 1,0 ml Substratlösung eingesetzt, dafür wird das Puffervolumen von 1,0 ml auf 0,1 ml verkleinert. Das Inkubationsmilieu bei Schritt II entspricht einem 0,067 m Phosphatpuffer, die Pufferkapazität wird also durch diese Abwandlungen nicht verändert. Im optischen Test laufen folgende Reaktionen ab:



(GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

DPN = Diphosphopyridinnucleotid

MDH = Malatdehydrogenase)

2. Herstellung der Asparaginase

Für die quantitative Messung der ATase-Aktivität mit Hilfe des DPN·H-abhängigen optischen Tests muß das Asparagin in Asparaginsäure überführt werden. Eine verhältnismäßig einfache und den übrigen Reaktionsablauf nicht beeinflussende Methode stellt die enzymatische Umwandlung von Asparagin in Asparaginsäure dar. Bei ihrer Anwendung wird vor allem vermieden, daß das nicht enzymatisch umgesetzte AT II-Amid angegriffen wird, was etwa bei Verwendung der sauren

oder alkalischen Hydrolyse der Fall wäre.

Zunächst wurde die Methode von Meister (75) zur Herstellung von Asparaginase aus Meerschweinchen-Serum angewandt: Fraktionierung des Serums mit 30 %igem Natriumsulfat, anschließende Reinigung mit Kalziumphosphat-Gel.

(Protokoll: s. Anhang 1.)

Qualitative Prüfung des hergestellten Enzyms:

Asparagin wurde mit Enzym inkubiert; in bestimmten Zeitabständen wurde eine Probe entnommen und die Reaktion durch Praecipitation des Enzyms gestoppt. Dann wurde mit Hilfe der Papierchromatographie in jeder Probe das verbliebene Asparagin von der Asparaginsäure getrennt und durch Anfärbung mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Durch Vergleich mit ebenfalls auf das Papier aufgetragener Asparagin- bzw. Asparaginsäurelösung konnte festgestellt werden, daß das extrahierte Enzym wirklich Asparaginase-Aktivität besitzt. (Skizze: s. Abb. 1; Protokoll: s. Anhang 2.)

Prüfung von Reinheit und Aktivität der Asparaginase:

Eine bestimmte Menge Asparagin wurde bei konstanter Temperatur mit Asparaginase inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und der Gehalt an gebildeter Asparaginsäure sofort im optischen Test gemessen. Doppelbestimmungen zeigten, daß die Schwankungsbreite der Ergebnisse innerhalb eines Versuchs 2 % nicht überstieg. Die Wiederfindung von eingewogenem Asparagin betrug in verschiedenen Versuchen zwischen 90 und 100 % und war damit ausreichend hoch. Leerwertkontrollen ergaben, daß das Enzym weder durch Asparagin noch durch Asparaginsäure in meßbarer Konzentration verunreinigt war. 0,1 ml Enzym setzten 1000 γ Asparagin in einer Stunde fast vollständig um. Wie später gezeigt wird, reicht diese Aktivität aus, um auch extrem erhöhte ATase-Werte in Patientenseren erfassen zu können.

(Protokoll: s. Anhang 3.)

Prüfung der Asparaginase auf ATase-Aktivität:

Hypertensin Ciba wurde mit Asparaginase inkubiert, wobei mit Suostratsättigung gearbeitet wurde. Anschließend wurde im optischen Test der Asparaginsäure-Gehalt bestimmt. Es stellte sich heraus, daß die Asparaginase durch Enzyme verunreinigt war, die aus AT II-Amid Asparagin freisetzen. Die Aktivität dieser Enzyme war unter den gewählten Versuchsbedingungen so groß, daß die Methode insgesamt zu unempfindlich geworden wäre, hätte man den Fehler lediglich durch jeweils einen Leerwertansatz korrigieren wollen. (Protokoll: s. Anhang 4.)

Versuche zur Hemmung der ATase-Aktivität in dem Asparaginase-Präparat:

Es mußte also versucht werden, die ATase-Aktivität in der Asparaginase selektiv zu hemmen oder abzutrennen, so daß die Versuchsergebnisse nicht mehr wesentlich beeinflußt wurden. Verdünnungsexperimente ergaben, daß bei ausreichender Verminderung der ATase-Aktivität auch die Asparaginase-Aktivität reduziert war.

(Protokoll: s. Anhang 5.)

Hemmversuche mit Titriplex und Cadmiumionen hatten ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Entweder war die Hemmung der ATase nicht ausreichend (Titriplex) oder die Asparaginase-Aktivität wurde gleichzeitig gehemmt (Cd^{++}).

(Protokoll: s. Anhang 6. und 7.)

Auch das Ergebnis einer Testserie mit verschieden stark angesäuerten Asparaginase-Präparaten war negativ: Die Aktivität der Asparaginase wurde durch Ansäuern zu stark gehemmt.

(Protokoll: s. Anhang 8.)

Ein positives Resultat brachte schließlich der Versuch, die störende Enzym-Aktivität durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat zu eliminieren: In der mit 25 %igem Ammonium-

sulfat praecipitierten Fraktion war die Asparaginase-Aktivität unverändert, während die ATase keine Aktivität mehr zeigte.

(Protokoll: s. Anhang 9.)

Prüfung der Abhängigkeit der Asparagin-Hydrolyse durch Asparaginase von der Inkubationszeit:

Ein Überschuß an Asparagin wurde mit stark verdünnter Asparaginase-Lösung inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurde die gebildete Asparaginsäure im optischen Test gemessen. Zwischen der Menge der freigesetzten Asparaginsäure und der Inkubationszeit besteht eine lineare Beziehung.

(Protokoll: s. Anhang 10.; graphische Darstellung: s. Abb. 2)

Herstellung von ATase-freier Asparaginase:

Aufgrund der beschriebenen Vorversuche wurde die von Meister (75) angegebene Methode zur Asparaginase-Herstellung in folgender Weise modifiziert: Meerschweinchenblut wird durch Herzpunktion gewonnen, heparinisiert und zentrifugiert. Das Plasma wird mit 30 %iger Na_2SO_4 -Lösung (Gewicht/Volumen) im Volumenverhältnis 1 : 1 leicht geschüttelt und bei Zimmertemperatur 1 Stunde stehengelassen. Danach wird der Überstand abzentrifugiert, das Praecipitat in der Hälfte des Plasmavolumens 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst und anschließend 24 Stunden bei etwa 5°C gegen mehrere Wechsel 0,9 %iger Kochsalzlösung dialysiert. Zur Eliminierung der ATase wird dann mit Ammoniumsulfat fraktioniert: Die Enzymlösung wird nacheinander auf die Substratkonzentrationen (Gewicht/Volumen) 15 %, 25 %, 35 %, 45 %, 60 % Ammoniumsulfat gebracht. Das Ammoniumsulfat wird in fester Form zu der Ausgangslösung bzw. dem jeweiligen Überstand gegeben. Der Ansatz (Fraktion I -V) wird jeweils für eine halbe Stunde im Kühlschrank stehengelassen, dann zentrifugiert und das Sediment in 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst. Die Fraktionen werden gegen mehrere Wechsel 0,9 %iger Kochsalzlösung dialysiert und in der Kühltruhe

gelagert. Mit dem optischen Test werden zunächst alle Fraktionen auf ATase-Aktivität geprüft, indem sie mit Hypertensin Ciba inkubiert werden. Die Asparaginase-Aktivität der Fraktionen wird durch Inkubation mit Asparagin bestimmt.

(Protokoll zur Herstellung der Hilfssubstanzen für den optischen Test: s. Anhang 11.)

Die höchste Asparaginaseaktivität wird in der Fraktion II (25 % Ammoniumsulfat) gefunden. Diese Fraktion weist keine ATase-Aktivität auf, so daß sie für die Testung von Patientenserum geeignet ist. Sie wird in der Kühltruhe in mehreren Portionen eingefroren, von denen jeweils eine für die Versuche bei Zimmertemperatur aufgetaut wird.

Eine Serie von Doppelbestimmungen der ATase-Aktivität in Patientenserum ergibt eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Bei einem Aktivitätsbereich von 8 IE/l bis 30 IE/l betrug die Abweichung vom Mittelwert $0,39 \pm 0,37$ IE/l. (Protokoll: s. Anhang 12.)

3. Herstellung der Substrat-Lösung (pH 6,4)

Für jeden Ansatz wurden 5 mg Hypertensin Ciba ad 2 ml 0,067m Natriumphosphatpuffer gelöst. Die Substratkonzentration ist so mit $1,8 \times 10^{-3}$ m etwa achtmal größer als die Michaelis-konstante der ATase (Erläuterung: s. D.II.1.). Es ist also gewährleistet, daß die Menge des gebildeten Asparagin allein von der Enzymkonzentration im Serum abhängt.

4. Praktische Ausführung der ATase-Bestimmung

Schritt I : 1,5 ml Substratlösung werden mit 0,5 ml Serum (verdünnt mit 0,9 %iger Kochsalzlösung 1 + 1) 60 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird beendet durch Ausfällung des Enzyms mit 0,2 ml 5n HClO₄ und anschließendes

Zentrifugieren für 20 Minuten bei 3000 U/min.
Das Praecipitat wird verworfen, der Überstand
durch Zugabe von ca. 0,2 ml 5n KOH wieder
neutralisiert; die pH-Prüfung erfolgt mit Hil-
fe von hauchfein ausgezogenen Glaskapillaren
und Universal-Indikatorpapier.

Schritt II: 1,5 ml dieser Lösung werden mit 0,2 ml eines
konzentrierten Na-Phosphatpuffers (0,67 m, pH
7,2) und 0,2 ml Asparaginase 60 Minuten bei
37°C inkubiert.

Schritt III: Optischer Test: Photometer "Eppendorf"

Filter 366 m μ

Cuvette: Schichtdicke 1 cm

Meßvolumen 3 ml

Raumtemperatur

Nacheinander werden in die Cuvette pipettiert:

1,86 ml 0,067 m Na-Phosphatpuffer pH 7,2

1,00 ml Inkubationslösung von Schritt II

0,02 ml MDH-Suspension

0,02 ml GOT-Suspension

0,05 ml DPN-H-Lösung

Die Lösungen werden mit einem Plastikspatel
gemischt. Anschließend wird die Extinktion E_1
abgelesen. Dann wird die Reaktion gestartet
durch Einmischen von

0,05 ml α -Ketoglutarat-Lösung.

Nach genau 10 Minuten wird die Extinktion E_2
abgelesen.

(Protokoll zur Herstellung der Lösungen und Suspensionen:
s. Anhang 11.)

Berechnung: Der Fehler, der durch die Verdünnung des Cu-
vetteninhalts mit 0,05 ml α -Ketoglutarat nach dem Ablesen
von E_1 entsteht, wird eliminiert durch Multiplikation von
 E_1 mit dem Korrekturfaktor $\frac{3,00}{3,05} = 0,98$

$$E_1 \times 0,98 = E_1 \text{ kor.}$$

Die Differenz zwischen $E_1 \text{ kor.}$ und E_2 ist ΔE .

$$\frac{\Delta E \times 3 \times 133}{3,3 \times 10^3} = \text{mg Asparaginsäure in der Cuvette.}$$

(3 = Volumen in der Cuvette,

133 = Molekulargewicht der Asparaginsäure,

$3,3 \times 10^3$ = Extinktionskoeffizient von DPN·H
bei 366 m μ [cm²/mMol])

$$\Delta E \times 0,121 = \text{mg Asparaginsäure in der Cuvette.}$$

Um das Ergebnis in Internationalen Einheiten (IE/l Serum) zu erhalten, wird dieser Wert noch mit dem Faktor 1522 multipliziert. (Definition der Internationalen Enzymeinheit: Sie ist die Enzymmenge, die 1 μ Mol Substrat pro Minute bei optimalem pH-Wert und 37°C umsetzt (93).)

II. Biochemische Eigenschaften der ATase

1. Michaeliskonstante

Die Michaeliskonstante ist die Substratkonzentration, bei der eine enzymatische Reaktion bei gegebener Enzymkonzentration mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Ihre Bestimmung ist deshalb wichtig, weil nur mit ihrer Hilfe optimale Versuchsbedingungen (d.h. hier: Substratsättigung) geschaffen werden können, wie sie zur Bestimmung der Enzymaktivität gefordert werden müssen. Bei zu hoher Substratkonzentration ist eine Hemmung der Reaktion möglich. Diese mußte durch einen entsprechenden Versuch ausgeschlossen werden.

Die Michaeliskonstante der ATase, die in einem Substratkonzentrationsbereich von $1,34 \times 10^{-5}$ M/l bis $1,6 \times 10^{-3}$ M/l bestimmt wurde, liegt bei $2,35 \times 10^{-4}$ M/l AT II-Amid.

(Protokoll: s. Anhang 13.a); graphische Darstellung: s. Abb. 3.)

Die für die ATase-Aktivitätsbestimmung in Patientenserum gewählte Substratkonzentration liegt bei etwa $1,8 \times 10^{-3}$ M/l AT II-Amid. Sie ist damit etwa achtmal größer als die Michaeliskonstante. Diese Konzentration ist um ein geringes höher als der oberste Wert des zur Bestimmung der Konstante verwendeten Bereichs. Stellt man das Verhältnis der Substratkonzentration zur Enzymaktivität graphisch dar, so erhält man eine Kurve, die sich einer Parallelen zur x-Achse asymptotisch nähert (s. Abb. 4.). Aus der Lage des letzten ermittelten Punktes auf dieser Kurve, der etwa der für die weiteren Versuche gewählten Substratkonzentration entspricht, ergibt sich, daß in diesem Bereich Substratsättigung herrscht, eine Substrathemmung des Enzyms jedoch ausgeschlossen werden kann.

2. pH-Optimum

Das pH-Optimum der ATase wurde im Bereich von pH 3,6 bis pH 9,0 geprüft. Die Enzymaktivität wird erst von pH 4,6 an meßbar (in 0,1 m Eisessig-Na-Acetatpuffer). Das pH-Optimum liegt bei 6,4 (in 0,067 m Na-Phosphatpuffer). Es folgt dann ein zweites Aktivitätsmaximum etwa bei pH 8,6 (in 0,05 m Tris-HCl-Puffer).

(Protokoll: s. Anhang 13.b); graphische Darstellung: s. Abb. 5)

Dieses Ergebnis kann auf zweierlei Art interpretiert werden: Erstens könnte es sich um zwei pH-Optima desselben Enzyms in verschiedenen Puffern handeln (0,067 m Na-Phosphatpuffer läßt sich nur bis zu einem pH-Wert von etwa 8,0 herstellen; es ist also nicht zu umgehen, für höhere pH-Bereiche einen anderen Puffer zu verwenden). Zweitens

könnte es sich bei dem zweiten Aktivitätsgipfel um das pH-Optimum eines weiteren AT II-Amid-spaltenden Enzyms handeln. Dies ist die wahrscheinlichere Lösung.- Die Inkubation der Patientenserum mit AT II-Amid wurde aufgrund dieses Versuchsergebnisses bei pH 6,4 vorgenommen.

III. Versuche mit natürlichem AT II und β -AT II

Von natürlichem AT II (α -L-Asp¹-Val⁵-AT II) stand nur eine sehr geringe Menge zur Verfügung, so daß nur zwei orientierende Versuche zu der Frage durchgeführt werden konnten, ob die Inaktivierung des synthetischen AT II-Amid und des natürlichen AT II durch menschliches Serum identisch sind. Zunächst wurde die Spaltungsgeschwindigkeit der beiden Substrate in menschlichem Serum verglichen, und zwar einmal bei einem pH-Wert von 6,4 (pH-Optimum der AT II-Amid-Inaktivierung), ein zweites Mal bei dem biologischen pH-Wert von 7,2. AT II-Amid wurde erheblich schneller abgebaut als AT II. Bei pH 6,4 betrug das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten AT II-Amid : AT II = 14,7; bei pH 7,2 betrug es nur 6,3. Die pH-Optima des Abbaus der beiden Substrate müssen also verschieden sein. Das legt den Schluß nahe, daß sie durch verschiedene Enzyme gespalten werden.

(Protokoll: s. Anhang 14.)

Diese Vermutung wird bestärkt durch das Ergebnis des zweiten Versuchs, bei dem die beiden Substrate 1. gemischt und 2. getrennt mit Plasma inkubiert wurden. Bei der gemeinsamen Inkubation läßt sich die aus natürlichem AT II gebildete Asparaginsäure direkt bestimmen, indem bei der Hälfte des Ansatzes der zweite Inkubationsschritt weggelassen und sofort der optische Test durchgeführt wird. Der zweite Teil des Ansatzes wird mit Asparaginase inkubiert.

Die anschließend im optischen Test gemessene Asparaginsäure-Konzentration entspricht dem Abbauprodukt beider Substrate. Durch Subtraktion läßt sich aus diesen beiden Ergebnissen die aus AT II-Amid abgespaltene Menge an Asparaginsäure ermitteln. - Bei gemeinsamer Inkubation der beiden Substrate wurde die Hydrolyse von Asparagin aus AT II-Amid durch die Anwesenheit von AT II fast vollständig gehemmt. Die Spaltung von AT II wurde durch die Anwesenheit von AT II-Amid ebenfalls zu einem erheblichen Teil verringert. Auch dieses Ergebnis spricht gegen die Annahme, daß beide Substrate durch das gleiche Enzym hydrolysiert werden.

(Protokoll: s. Anhang 15.)

In einem weiteren Versuch wurde die Spaltungsgeschwindigkeit von AT II-Amid durch menschliches Serum mit der von β -L-Asp¹-AT II verglichen. Die letztere Substanz wird durch menschliches Serum nicht meßbar abgebaut.

(Protokoll: s. Anhang 16.; graphische Darstellung: s. Abb. 6.)

IV. Bestimmung der ATase-Aktivität im Serum von Gesunden, Schwangeren, Hypertonikern und Leberkranken

1. Beschreibung der Versuchspersonen

a) Normotoniker

Es handelt sich um 26 Versuchspersonen, die z.T. gesund waren (Klinikpersonal), z.T. Patienten der Klinik, die weder an einem Hypertonus noch an Nieren- oder Leberkrankheiten litten. In allen Fällen war die Familie frei von Hochdruckerkrankungen. Das Durchschnittsalter betrug 32 Jahre.

b) Schwangere

Die Versuchspersonen waren 14 Frauen im ersten und 14 Frauen im dritten Trimenon der Gravidität. Alle wurden regelmäßig in der Frauenklinik der Freien Universität Berlin untersucht. Sowohl der Verlauf der Schwangerschaft als auch der Blutdruck waren bei allen Frauen normal.

c) Patienten mit 'essentieller' Hypertonie

21 Patienten, deren Hypertonus keine Ursache erkennen ließ; i.v. Pyelogramm, Urinsediment, Phenolrot-Ausscheidung, maximales Harnkonzentrationsvermögen, Serum-Kalium und Serum-Kreatinin waren bei allen Patienten normal. In 13 Fällen waren im EKG, auf Röntgen-Aufnahmen des Thorax und am Augenhintergrund keine oder nur geringe Folgen der Hochdruckerkrankung zu erkennen. Sie wurden als 'beginnende essentielle Hypertonie' klassifiziert. - In 8 Fällen handelte es sich nach den eben erwähnten Kriterien und der Höhe des diastolischen Blutdrucks um Patienten mit 'fortgeschrittener essentieller Hypertonie'. Röntgenologisch waren bei keinem der Patienten stenosierende Prozesse an den Nierenarterien zu finden.

d) Hypertoniker mit Nierenarterienstenose (NAS)

Die NAS wurden arteriographisch gesichert. Von insgesamt 16 Patienten fanden sich in 11 Fällen einseitige NAS, in 2 Fällen doppelseitige NAS und in 3 Fällen Nierenarterienverschlüsse (NAV). Die hämodynamische Wirksamkeit der NAS wurde in 10 Fällen durch seitengetrennte Nierenfunktionsprüfungen bzw. Nachweis des totalen NAV gesichert. Der Hy-

pertonus war in der Regel fortgeschritten, in 3 Fällen maligne mit leichter Serum-Kreatinin-Erhöhung und Hypokaliämie.

e) Patienten mit Nierenparenchymerkrankungen

Von insgesamt 10 Versuchspersonen litten 5 an chronischer Pyelonephritis (4 Hypertoniker, 1 Normotoniker) und 5 an einem durch subakute oder chronische Glomerulonephritis ausgelösten nephrotischen Syndrom (2 Hypertoniker, 3 Normotoniker). Die Serum-Kreatinin-Werte waren in 5 Fällen leicht erhöht, die Serum-Kalium-Werte in 3 Fällen leicht vermindert.

f) Patienten mit Lebererkrankungen

Von 17 Versuchspersonen mit Lebererkrankungen bestand bei 9 Patienten eine Cirrhose, bei 6 Patienten eine infektiöse Hepatitis und bei 2 Patienten ein Verschlußikterus. In einem Fall fand sich neben der Hepatitis zusätzlich eine chronische interstitielle herdförmige Nephritis. Hier war der mittlere Blutdruck sowohl systolisch als auch diastolisch deutlich erhöht, In allen anderen Fällen war der Blutdruck normal oder erniedrigt.

2. Zusätzliche Untersuchungen

a)

Der Angiotensin-Infusionstest nach Kaplan und Silah (54) wurde an 12 der Normalpersonen, an 14 der Patienten mit

essentieller Hypertonie, an 4 der Patienten mit Nierenparenchymerkrankungen (3 Hypertoniker, 1 Normotoniker) und an 13 der Patienten mit NAS durchgeführt.*

Die Werte werden in ng/kg Körpergewicht/min angegeben.

b)

Bei 12 Schwangeren und 10 Patienten mit Lebererkrankungen wurde die Serum-LAP-Aktivität bestimmt. Es wurde der Farb-Test der Firma Boehringer-Mannheim benutzt. Der Normalwert liegt mit dieser Methode bei 8 bis 22 mU/ml Serum.

* Ausgeführt von Dr. W. Oelkers und H.J.Langholz

3. Ergebnisse

Diagnose	Anzahl	Serum-Angiotensinase-Aktivität				Sign.
		Mittelwert(IE/l)	SD(IE/l)	Extremwerte		
<u>Normoton.</u>	26	12,3	$\pm 4,1$	6,3 - 18,6		
<u>Gravid.:</u>						
1.Trim.	14	10,5	$\pm 3,8$	4,2 - 16,9		-
3. Trim.	14	10,6	$\pm 3,5$	6,3 - 17,4		-
<u>Hyperton.</u>						
Essent.	21	12,9	$\pm 3,2$	6,8 - 17,6		-
NAS	15	13,6	$\pm 5,3$	5,5 - 22,8		-
Nierenpar.	10	11,6	$\pm 2,4$	5,7 - 17,9		-
<u>Lebererkr.</u>						
Cirrhose	9	19,2	$\pm 6,7$	12,7 - 34,3	0,2-0,5	
Hep.epid.	6	30,0	$\pm 13,4$	12,0 - 48,0	0,2-0,5	
Verschl.ikt.	2	21,1	-	20,6 - 25,6		-

(Graphische Darstellung: s. Abb. 7)

Der Mittelwert der Serum-ATase-Aktivität bei 21 Patienten mit 'essentieller' Hypertonie, 15 Patienten mit Hypertonie und NAS und bei 10 Patienten mit Nierenparenchymerkrankungen mit oder ohne Hypertonus ist nicht signifikant verschie-

den von dem der Kontrollgruppe. - Dagegen liegen die Mittelwerte bei 17 Patienten mit Leberparenchymerkrankungen deutlich höher als die der Kontrollgruppe. Allerdings ist die Zahl der untersuchten Patienten zu gering, und die Standard-Abweichungen sind zu hoch, um die Unterschiede statistisch zu sichern. - Bei 28 Schwangeren im 1. und 3. Trimenon sind die Mittelwerte gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert.

Einzelergebnisse:

1. Patienten mit 'essentieller' Hypertonie

Nr.	Alter (Jahre)	Kreatinin mg%	Fundus	RR mm/Hg	AT-Test ng/kg/min	ATase-Akt. IE/l
1	46	0,7	I	240/135	2,3	13,4
2	39	0,8	I	180/110	9,2	12,1
3	31	1,1	o	150/100	5,2	10,9
4	24	0,8	I	150/100	-	8,9
5	37	1,1	I + II	220/150	8,6	6,8
6	33	1,2	o	160/110	6,0	15,8
7	47	0,9	o	180/ 90	-	9,2
8	50	0,8	o	170/100	7,0	12,3
9	46	1,0	III	175/120	10,7	11,4
10	38	0,7	o	200/120	7,3	14,5
11	39	1,2	II	200/130	5,6	11,2
12	40	1,2	-	170/135	-	11,6
13	23	1,6	I	175/110	7,1	13,6
14	40	0,7	-	165/100	-	17,1
15	54	0,8	I	190/120	3,3	14,5
16	24	1,2	o	145/ 90	-	15,3
17	26	0,9	I	170/115	7,3	10,9
18	29	1,0	o	180/105	-	17,1
19	18	-	o	155/105	-	9,2
20	52	1,2	o	150/100	8,2	7,4
21	33	0,7	o	170/120	6,6	8,1

2. Patienten mit NAS

Nr.	Alter (Jahre)	Kreatinin mg%	Fundus	RR mm Hg	AT-Test ng/kg/min	ATase-Akt IE/l
1	60	0,9	I	235/130	4,9	18,6
2	18	0,8	o	180/100	5,2	10,3
3	46	0,9	-	210/130	22,4	5,5
4*	24	0,9	o	160/90	-	15,4
5	54	1,1	III	240/130	8,1	22,8
6	26	0,8	o	190/130	3,6	16,0
7	54	0,8	o	180/110	5,4	11,5
8*	56	1,2	II	220/110	4,4	11,4
9	60	0,8	II	200/110	6,5	22,8
10	57	1,0	I	225/120	5,9	5,9
11	38	0,8	II	210/140	9,4	11,6
12	64	1,2	I	200/110	-	7,9
13	25	0,9	I	190/120	5,5	16,7
14	45	1,0	II	225/120	10,0	13,6
15*	48	1,5	III	250/145	9,7	14,2
16*	60	1,7	I	190/115	10,9	17,7

Bei den mit * markierten Fällen handelt es sich um Patienten mit NAV.

Bei 2 Patienten mit NAV lag die ATase-Aktivität signifikant über dem Mittelwert der Kontrollgruppe. In beiden Fällen lag die AT-Pressordosis im Normbereich. Die dritte Patientin mit NAV zeigte eine Serum-ATase-Aktivität an der oberen Grenze der Norm, während die AT-Pressordosis mäßig erhöht war. Möglicherweise werden von dem ischämischen Nierengewebe ATasen ins Blut abgegeben.

3. Patienten mit Nierenparenchymerkrankungen

Nr.	Alter (Jahre)	Kreatinin mg%	Fundus	RR mm Hg	AT-Test ng/kg/min	ATase-Akt IE/l
1	34	0,9	o	170/110	4,8	11,2
2	39	2,8	III	230/120	-	16,5
3	31	1,1	o	105/75	12,7	7,4
4	38	1,3	I	180/115	20,7	12,7
5	27	1,0	o	165/105	6,7	16,2
6	45	1,8	-	120/ 75	-	9,9
7	65	1,5	I	135/ 90	-	17,9
8	30	1,5	(I)	150/ 95	-	5,7
9	18	9,5	-	155/ 95	-	4,6
10	57	0,9	I	130/ 80	-	14,2

1-5: Chron. Pyelonephritis, 6-10: Nephrot. Syndrom

4. Patienten mit Lebererkrankungen

Nr.	Alter (Jahre)	SGPT mU/ml	RR mm Hg	ATase-Akt. IE/l	LAP-Akt. mU/ml
1	52	51	110/ 70	16,6	-
2	58	75	115/ 75	22,3	63,7
3	70	27	115/ 80	16,4	-
4	58	16	125/ 85	12,7	-
5	55	14	110/ 65	13,2	-
6	67	65	120/ 80	34,3	71,2
7	50	248	145/ 80	24,4	-
8	65	9	140/ 80	17,3	31,3
9	27	27	165/105	16,2	-
10	41	433	105/ 60	12,0	37,0
11	17	28	110/ 80	48,0	51,8
12	66	377	130/ 80	41,8	100,0
13	65	36	125/ 75	33,1	67,0
14	29	680	95/ 60	20,8	52,9
15	39	130	115/ 70	24,5	34,6
16	60	11	100/ 65	20,6	43,2
17	87	-	150/ 75	25,8	-

1-9: Cirrhose; 10-15: Hepatitis epidemica; 16,17: Verschlußikterus. - Bei Fall 9 bestand zusätzlich eine chronische interstitielle herdförmige Nephritis.

5. Vergleich von ATase- und LAP-Aktivität

Diagnose	Anzahl	ATase (Mittelw.) IE/l	L A P Mittelw. Extr.w. mU/ml	r ATase-LAP
Hep.epid.	6	30,0	69,0	37-122
Cirrhose	3	24,6	55,4	31- 71
Verschl.ikt.	1	20,6	43,2	-
Gravid.				
1. Trim.	7	12,6	20,0	4- 44
3. Trim.	5	12,1	88,9	72-139
				+0,79 (p 0,001)
				-0,49 (p=0,1)

(Graphische Darstellung: s. Abb. 8)

Die Aktivität der Serum-LAP ist bei Schwangeren im 1. Trimenon im Mittel normal. Nur zwei Patientinnen zeigten leicht erhöhte Werte. Dagegen waren die Werte bei Schwangeren im 3. Trimenon im Mittel stark erhöht; selbst der niedrigste gemessene Wert lag noch höher als das Dreifache der oberen Normgrenze. Die Korrelation zwischen ATase- und LAP-Aktivität war nicht signifikant.

Bei Patienten mit Lebererkrankungen wurde eine deutlich erhöhte LAP-Aktivität im Serum gemessen. Hier war die Korrelation zwischen beiden Enzymaktivitäten hochsignifikant positiv.

E. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

I. Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode beschrieben, mit der die Amino-peptidase-Aktivität im Serum gegenüber α -L-Asp¹-NH₂-AT II gemessen werden kann. Die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Asp¹ und Arg² ist mit großer Wahrscheinlichkeit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Inaktivierung des AT II im zirkulierenden Blut (17,19,29,56,59,78). Eine von verschiedenen Autoren (29,88,91) beschriebene Endopeptidase spielt offenbar beim AT II-Abbau im strömenden Blut unter physiologischen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle. AT II-Analoga, die gegen den Abbau durch Amino-peptidasen geschützt sind, werden durch Plasma wesentlich langsamer inaktiviert als das AT II bzw. AT II-Amid (91). Es ist denkbar, daß unter bestimmten pathologischen Bedingungen ihre Aktivität stärker erhöht ist. Dieser Fall könnte z.B. bei erheblichem Zellzerfall in Körperorganen eintreten. Möglicherweise übertrifft in einzelnen Organen auch unter physiologischen Bedingungen die Aktivität anderer AT II-inaktivierender Enzyme die der Amino-peptidase. Es gibt dafür bisher jedoch keinen Anhalt.

In diesen Fällen wird mit dem optischen Test u.U. nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der AT II-Inaktivierung gemessen. Auch unter diesen Bedingungen läßt sich jedoch die Amino-peptidase-Aktivität fehlerfrei bestimmen, da mit so hohem Substratüberschuß gearbeitet wird, daß die Substratverdünnung durch die entstehenden Peptidfragmente nicht ins Gewicht fallen würde.

Für die vorliegenden Untersuchungen der ATase-Aktivität im Serum wurde überwiegend das α -L-Asp¹-NH₂-AT II als

Substrat verwandt. Eine Überprüfung der Methode mit α -L-Asp¹-AT II als Substrat brachte ein positives Ergebnis. Mit diesem Substrat läßt sich die ATase-Aktivitätsbestimmung sogar in erheblich vereinfachter Form durchführen, da die Überführung von Asparagin in Asparaginsäure fortfällt.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen der ATase-Bestimmung läßt sich keine Aussage über die endogene AT II-Hydrolyse machen. Es können lediglich die Ergebnisse anderer Autoren, die überwiegend ebenfalls die Enzymaktivität gegenüber AT II-Amid bestimmten, überprüft werden. Außerdem konnte der Einfluß der intravasalen Inaktivierung von infundiertem AT II-Amid auf die vasopressorische Wirkung dieser Substanz untersucht werden.

II. Biochemische Daten

Die Michaeliskonstante der mit Hilfe des optischen Tests gemessenen Aminopeptidase beträgt $2,35 \times 10^{-4}$ Mol/l.

Klaus et al. (59) sind die einzigen Autoren, deren Ergebnisse aufgrund der von ihnen angewandten Methode mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. Sie geben eine Michaeliskonstante von $0,6 \times 10^{-4}$ Mol/l an.

Das pH-Optimum wurde mit Hilfe des optischen Tests in Phosphatpuffer bei pH 6,4 gefunden. Dieser Wert liegt nahe bei dem von Klaus et al. (59) gefundenen pH-Optimum von 6,5 (ebenfalls in Phosphatpuffer). Khairallah und Page (58) bestimmten das pH-Optimum der AT II-Amid-spaltenden Aminopeptidase mit pH 7,4. Sie geben jedoch nicht an, welchen Puffer sie benutzten.

Diese Daten gelten für das Enzym, das das AT II-Amid inaktiviert, nicht jedoch für das AT II-spaltende Ferment. Über dieses kann aufgrund der wenigen Versuche mit natürlichem AT II als Substrat nur ausgesagt werden, daß sein

pH-Optimum weiter im alkalischen Bereich liegen muß als das des AT II-Amid-spaltenden Enzyms. Khairallah und Page (58) fanden es für die 'Angiotensinase A₂', die spezifisch für α -L-Asp-AT II ist, bei pH 6,8. Sie benutzten den biologischen Blutdrucktest an der Ratte.

III. Angiotensin-Infusionstest

Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen optischen Test kann die ATase-Aktivität im zirkulierenden Blut gegenüber infundiertem AT II-Amid exakt bestimmt werden. Die AT-Pressordosis korreliert nicht signifikant mit der ATase-Aktivität des Plasmas von gesunden Versuchspersonen und Hypertonie-Patienten. Die Unterschiede in der Blutdruck-Wirkung von infundiertem AT II-Amid beruhen in diesen Fällen also nicht auf einer unterschiedlich schnellen intravasalen Inaktivierung dieser Substanz.

Ein Einfluß der ATase-Aktivität auf die pressorische AT-Wirkung bei Patienten mit stark erhöhten ATase-Werten, z.B. bei Leberkranken, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Johnston und Jose (53) stellten eine verminderte AT-Empfindlichkeit bei Patienten mit Lebercirrhose und sekundärem Aldosteronismus fest. Laragh (69) mußte bei Lebercirrhotikern drei- bis fünfmal soviel AT II-Amid wie bei Gesunden infundieren, um den gleichen Blutdruck-Anstieg zu erzielen. Klaus und Mitarbeiter (61) fanden eine meßbare Abschwächung der vasopressorischen Wirkung von AT II-Amid, wenn Schweinenieren-Aminopeptidase in so hoher Konzentration infundiert wurde, daß die in vitro gemessene ATase-Aktivität auf das Vier- bis Fünffache gesteigert war.

Hodge und Mitarbeiter (48) beschreiben eine im Vergleich zu seinem intravasalen Abbau wesentlich beschleunigte In-

aktivierung von AT II-Amid, wenn es mit parenchymatösen Organen in Kontakt kommt. In die portale Strombahn injiziertes AT II-Amid hat eine geringere Blutdruckwirkung, als wenn es in eine periphere Vene injiziert wird (21, 66, 76, 116). Klaus et al. (62) fanden ebenso wie Brunner et al. (17), daß α - und β -AT II eine vergleichbare vasopressorische Wirkung haben, während die Inaktivierung durch Plasma in vitro bei α -AT II vier- bis fünfmal schneller erfolgt als bei β -AT II. Die Autoren schließen daraus ebenfalls, daß die Inaktivierung des AT II-Amid im strömenden Blut von untergeordneter Bedeutung ist. - Es ist möglich, daß in der Leber oder in der Muskulatur, besonders in der Muskelschicht der Arteriolenwand (dem Erfolgsorgan des AT II) die ATase-Aktivität wesentlich höher ist als im zirkulierenden Blut. Ein Einfluß der Inaktivierungsrate von infundiertem AT II-Amid auf seine vasopressorische Wirksamkeit kann also nicht generell ausgeschlossen werden. - Verschiedene Autoren diskutieren eine Abhängigkeit der AT-Pressordosis von anderen Faktoren, vor allem von den Elektrolytverhältnissen des Körpers bzw. des Erfolgsorgans, der Arteriolenwand (1, 8.98).

IV. Unterschiedliche Inaktivierung von AT II und AT II-Amid

Es wurde bereits darauf hingewiesen (Kap. B.), daß Regoli et al. (91) und Nagutsu et al. (78) aufgrund ihrer Versuche die Vermutung äußerten, der Abbau von AT II und AT II-Amid erfolge durch verschiedene Enzyme. In der vorliegenden Arbeit wurden einige wenige Experimente zur Prüfung dieser These beschrieben. Die Ergebnisse sind zwar als Einzelbefunde - der Mangel an natürlichem AT II machte größere Versuchsserien unmöglich - nur vorsichtig zu interpretieren. Sie scheinen jedoch in die gleiche Richtung zu

weisen wie die Ergebnisse der genannten Autoren: Offenbar sind unterschiedliche Enzyme an der biologischen Inaktivierung des AT II und des AT II-Amid durch Plasma beteiligt. Durch neuere Befunde von Khairallah und Page (58) wird dieses Ergebnis bestätigt. Diese Autoren konnten aufgrund unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften drei verschiedene ATasen voneinander abgrenzen: 'ATase A₁' ist spezifisch für die Inaktivierung von AT II-Amid; 'ATase A₂' hydrolysiert nur das endogene AT II; 'ATase B' inaktiviert AT II, AT II-Amid und verschiedene andere AT II-Analoga, wobei das AT II-Amid doppelt so schnell gespalten wird wie die anderen Substanzen.

Lubash et al. (73) benutzten zur Messung der ATase-Aktivität im Serum die von Nagutsu und Mitarbeitern (78) entwickelte Methode mit ANA als Substrat, das vermutlich von der gleichen Aminopeptidase hydrolysiert wird wie das endogene AT II. Parallel dazu verwandten sie den biologischen Blutdrucktest mit AT II-Amid als Substrat. Sie fanden eine signifikante Korrelation der Ergebnisse beider Methoden nur in der Gruppe der Normalpersonen. Bei den Hypertonikern war die Hydrolyse beider Substrate zwar nicht signifikant verschieden von der der Kontrollgruppe, es bestand aber keine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Methoden untereinander. Bei Patienten mit Lebercirrhose war die ANA-Hydrolyse nicht signifikant verschieden von den Kontrollwerten, während der AT II-Amid-Abbau signifikant beschleunigt war. Die Autoren schließen ebenfalls auf eine unterschiedliche Inaktivierung der beiden Substrate.

V. Klinische Untersuchungen

Die mit dem optischen Test gemessene ATase-Aktivität bei Gesunden und Kranken stimmt weitgehend mit den Ergebnissen von Klaus et al. (59) überein. Die Hydrolysegeschwindigkeit von AT II-Amid durch das Serum von Patienten mit 'essentiellern' oder renalem Hypertonus ist gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Klaus und Mitarbeiter (59) diskutieren die Möglichkeit einer relativen Aktivitätsminderung der ATase bei erhöhter endogener Reninkonzentration. Verschiedene Autoren (15,63,115) fanden bei Patienten mit essentiellern Hypertonus normale Reninwerte, während sie bei Patienten mit renalem Hochdruck oft erhöhte Plasma-Renin-Konzentrationen bzw. -Aktivitäten bestimmten. Oelkers und Mitarbeiter (80) untersuchten bei 9 Hypertonikern mit gesicherter NAS aus dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv unter anderem die Beziehung zwischen der Plasma-Renin-Konzentration und der ATase-Aktivität. Die Renin-Konzentration war nur bei zwei Patienten erhöht. Bei diesen war die ATase-Aktivität normal. Bei den übrigen Patienten mit z.T. hochnormaler ATase-Aktivität war der Reninspiegel normal. Nach diesen - wenn auch zahlenmäßig geringen - Befunden ist anzunehmen, daß keine regelhafte Beziehung zwischen der ATase-Aktivität und der Renin-Konzentration im Plasma besteht, auch nicht in dem von Klaus et al. (59) vermuteten Sinn. - Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch Itskovitz et al. (51) und Lubash et al. (72), die ebenfalls Parallelbestimmungen der Renin- und ATase-Aktivität im Plasma von Hypertonikern vornahmen (Itskovitz benutzte den biologischen Blutdrucktest und AT II-Amid als Substrat; Lubash verwendete daneben auch die Methode von Nagatsu et al. (78) mit ANA als Substrat).

Die geschilderten Ergebnisse der ATase- und Renin-Aktivitätsbestimmung widersprechen auch der These von Hickler et al. (47), daß beim renalen Hypertonus die ATase-Aktivität als Folge einer erhöhten Renin- bzw. AT II-Konzentration im Sinne einer Enzyminduktion steige. Dies gilt zumindest für das AT II-Amid-spaltende Enzym, auf dessen Bestimmung die These von Hickler und Mitarbeitern fußt.- Auch die Ergebnisse von Wood (120), der bei Hochdruckkranken verminderte Plasma-ATase-Aktivitäten fand, konnten nicht bestätigt werden.

Die ATase-Bestimmungen mit AT II-Amid als Substrat haben wahrscheinlich keine klinische Bedeutung. Sie geben keine Auskunft über die Hydrolyse des endogenen AT II. Die Ergebnisse von Haynes und Dexter (45), die allerdings mit einer sehr ungenauen Methode arbeiteten, lassen vermuten, daß die endogene AT II-Inaktivierung bei Hypertonikern ebenfalls nicht verändert ist. Zu dem gleichen Ergebnis kommen in neuerer Zeit Lubash et al. (72). Sie bestätigen die Befunde von Nagutsu und Mitarbeitern (78), deren ATase-Aktivitätsbestimmung mit ANA als Substrat die endogene AT II-Hydrolyse wahrscheinlich besser reflektiert als die Methoden, die AT II-Amid als Substrat verwenden. Beide Autorengruppen (72,78) fanden keine signifikanten Unterschiede der ANA-Hydrolyse bei Gesunden und Hypertonikern.

Osborn et al. (82) prüften die Plasma-Endopeptidase-Aktivität mit einem AT II-Analogen, das durch Veränderung am Aminoende vor dem Abbau durch Aminopeptidasen geschützt ist (Phenylthiocarbonyl-AT II-Amid). Sie fanden bei Hypertonikern ebenfalls keine Veränderung der Enzymaktivität gegenüber der von Gesunden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Plasma-ATase-Aktivität gegenüber AT II-Amid und wahrscheinlich auch die gegenüber AT II bei Hochdruckkranken nicht von der Norm abweichen.

Bei Patienten mit infektiöser Hepatitis, Lebercirrhose oder Verschlúßikterus wurden mit Hilfe des optischen Tests deutlich erhöhte Serum-ATase-Aktivitäten gefunden. Die Abweichung von der Norm konnte wegen der relativ kleinen Zahl der Patienten und der großen Standard-Abweichung statistisch nicht gesichert werden. Die parallel dazu bestimmte LAP-Aktivität war ebenfalls erhöht. Die positive Korrelation beider Enzymaktivitäten war hochsignifikant. Klaus und Mitarbeiter (59) fanden eine Steigerung der ATase-Aktivität bei Patienten mit den gleichen Lebererkrankungen um das Zwei- bis Fünffache der Norm. Sie stellten eine relativ gute Korrelation zwischen ATase-Aktivität und der ebenfalls erhöhten LAP-Aktivität fest. Mehrere andere Autoren fanden eine signifikant gesteigerte AT II-Amid-Hydrolyse bei Patienten mit Lebercirrhose (7,22,64).

Auch Lubash et al. (73) stellten im Serum von Patienten mit Lebercirrhose eine beschleunigte Inaktivierung von AT II-Amid fest. Dagegen fanden sie nur eine leichte, statistisch nicht signifikante Erhöhung der ANA-Hydrolysegeschwindigkeit. Haynes und Dexter (45) bestimmten bei Leberkranken mit einem biologischen AT II-Präparat als Substrat normale ATase-Aktivitäten. (Auf die Ungenauigkeit ihrer Methode wurde bereits hingewiesen.)

Aus diesen Befunden läßt sich die Vermutung ableiten, daß bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen (Cirrhose, Hepatitis epidemica, Verschlúßikterus) die intravasale AT II-Amid-Inaktivierung gesteigert ist, während der Abbau von endogenem AT II nicht oder nur wenig beschleunigt ist. Dieses Ergebnis, das noch keineswegs gesichert ist, würde der Annahme widersprechen, daß der bekannte Blutdruckabfall bei Leberkranken auf eine gesteigerte ATase-Aktivität des Plasmas zurückzuführen sei (z.B. 59).

Ob der gesteigerten AT II-Amid-Hydrolyse bei Leberkranken eine klinische Bedeutung zukommt, ist ungeklärt. Verschie-

dene Autoren (21,66,76,116) konnten eine Abschwächung der pressorischen Wirkung von AT II-Amid bei direkter Injektion in die portale Strombahn gegenüber der Injektion in eine periphere Vene zeigen. Es ist denkbar, daß beim Untergang von Leberzellen vermehrt AT II-Amid-spaltende Enzyme ins Blut abgegeben werden. In diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung von Itskovitz et al. (52) über die Plasma-ATase-Aktivität bei Hunden im Schock interessant (die allerdings noch am Menschen überprüft werden müßte). Die Autoren berichten von einer beschleunigten intravasalen Inaktivierung sowohl des AT II-Amid als auch des natürlichen AT II im Schock. Diese beruhte nach ihren Untersuchungen nicht auf einer Steigerung der bekannten, für das jeweilige Substrat spezifischen Enzymaktivitäten, sondern auf der Aktivität eines dritten Ferments, das weder für eins der Substrate spezifisch war noch verschiedene biochemische Eigenschaften der beiden bekannten Aminopeptidasen besaß. Die Autoren halten den Zelluntergang in ischämischem Gewebe und die Abgabe von intrazellulären proteolytischen Enzymen ins Blut für die Ursache der zusätzlichen ATase-Aktivität. Sie konnten sogar aus der Größe der Aktivitätssteigerung Schlüsse auf das Ausmaß der Zellschädigung ziehen und diskutieren die ATase-Bestimmung bei Schockpatienten als prognostisches und therapeutisches Hilfsmittel.

Bei Frauen im ersten Trimenon der Schwangerschaft wird die AT II-Amid-Hydrolyse mit dem optischen Test nur leicht beschleunigt gefunden. Die LAP-Aktivität ist normal. Im dritten Trimenon der Gravidität werden ebenfalls normale ATase-Aktivitäten gemessen, während die LAP-Aktivität stark erhöht ist. Die Korrelation zwischen beiden Enzymaktivitäten ist nicht signifikant.

Klaus et al. (59) berichten ebenfalls von normalen Serum-ATase-Aktivitäten gegenüber AT II-Amid am Ende der Schwan-

gerschaft bei deutlich erhöhten LAP-Aktivitäten. Sie konnten nachweisen, daß sich im Schwangerenserum kein Hemmstoff der Serum-ATase findet. - Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die Ergebnisse von Hickler et al. (47), die eine gesteigerte AT II-Amid-Hydrolyse im Plasma von Schwangeren fanden. - Nagutsu et al. (78) stellten eine signifikante Beschleunigung der ANA-Hydrolyse im dritten Trimenon der Schwangerschaft fest. Dieses Ergebnis wurde von Lubash et al. (74) bestätigt. Nagutsu und Mitarbeiter (78) fanden in dieser Gruppe eine signifikant erhöhte LAP-Aktivität. Bereits Page berichtet in seiner 1947 erschienenen Arbeit (83) von einem deutlichen Anstieg der Plasma-ATase-Aktivität gegenüber einem biologischen AT II-Präparat bei Schwangeren im dritten Trimenon (es gilt die gleiche Einschränkung wie bei Haynes und Dexter (45): die Unreinheit des Substrats).

Eine Klärung der widersprüchlichen Befunde steht noch aus. Die Tatsache, daß mit den beiden Methoden, die eine exakte Messung der Enzymaktivität erlauben, übereinstimmend eine normale AT II-Amid-Hydrolyse im Serum von Schwangeren gefunden wurde, spricht gegen das Ergebnis von Hickler et al. (47). Die identischen Ergebnisse von Page (83), Nagutsu und Mitarbeitern (78) und Lubash et al. (74) lassen - wenn die Annahme zutrifft, daß die Inaktivierung der von ihnen verwendeten Substrate ein Maß der biologischen AT II-Hydrolyse darstellt - auf eine gesteigerte endogene AT II-Inaktivierung am Ende der Schwangerschaft schließen. Eine mögliche Erklärung bieten Morandini et al. (77), die einen durch erhöhte Progesteron-Produktion stimulierten Natriumverlust und den zunehmenden Druck des Uterus auf die Vena cava inferior für die erhöhte Aktivität des AT-Renin-Systems verantwortlich machen, die ihrerseits eine Steigerung der ATase-Aktivität im Sinne der Hicklerschen Enzyminduktionsthese bewirken könnte. Erhöhte Renin- bzw. AT II- Kon-

Conzentrationen im Blut von Schwangeren wurden u.a. von Brown et al. (14), Fasciolo et al. (32) und Ripa et al. (96) gefunden. - Lubash et al. (74) konnten eine Steigerung der ANA-Hydrolyse durch Zufuhr von Östrogenen nachweisen. Sie vermuten, daß es sich nicht um eine spezifische ATase-Aktivitätssteigerung handelt, sondern daß durch weibliche Geschlechtshormone eine größere Anzahl unspezifischer Enzyme aktiviert wird, die u.a. ANA hydrolysieren.

VI. LAP-Aktivität gegenüber AT II-Amid

AT II-Amid wird durch LAP in 24 Stunden zu 90 % hydrolysiert, während unter den gleichen Bedingungen von AT II nur Spuren gespalten werden (91). Klaus und Mitarbeiter (59) stellten viele gemeinsame Eigenschaften der Hydrolyse von AT II-Amid und α -L-Leucyl- β -Naphthylamid (LNA) durch menschliches Serum fest. Nagatsu et al. (78) fanden, daß die ANA-Hydrolyse in menschlichem Plasma nur durch das natürliche AT II, nicht durch AT II-Amid kompetitiv gehemmt werden kann. Die Hydrolyse von LNA dagegen läßt sich nur durch AT II-Amid kompetitiv hemmen. - Alle diese Befunde sprechen dafür, daß Leucinaminopeptidasen an der AT II-Amid-Inaktivierung zumindest beteiligt sind, während sie offenbar für den biologischen Abbau von endogenem AT II eine oder kaum eine Rolle spielen. Für die Annahme einer Beteiligung von LAP bei der AT II-Amid-Hydrolyse spricht auch der Befund, daß im Serum Leberkranker zwischen der erhöhten ATase- und LAP-Aktivität eine signifikant positive Korrelation besteht (59, Ergebnisse dieser Arbeit). Scheinbar im Widerspruch dazu stehen die Befunde von Klaus et al. (59) und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß bei stark erhöhter LAP-Aktivität im Serum von Schwangeren im letzten Trimenon die ATase-Aktivität normal ist. Durch Papierelektrophorese (105, 106) und durch Säulenchromato-

graphie (6) lassen sich im Plasma mehrere Fraktionen mit LAP-Aktivität nachweisen, die unterschiedliche relative Substratspezifitäten zeigen und sich bei bestimmten Krankheitszuständen unterschiedlich verhalten. Eine Komponente dieses Enzymsystems mit LAP-Aktivität, die sich in der α_1 -Globulin-Fraktion im Plasma findet, zeigt bei Gallengangsverschlüssen erhöhte Aktivität (105,106). Ein zweites zu diesem System gehörendes Enzym in der α_2 -Globulin-Fraktion zeigt während des dritten Trimenons der Schwangerschaft gesteigerte Aktivität (105,106).

Es ist wahrscheinlich, daß einige Enzyme mit LAP-Aktivität an der Hydrolyse von AT II-Amid im Plasma beteiligt sind, während andere Leucinaminopeptidasen AT II-Amid nicht angreifen. Während der Schwangerschaft ist die gesteigerte LAP-Aktivität wahrscheinlich auf eine Vermehrung der Enzymfraktionen zurückzuführen, die gegenüber AT II-Amid keine Wirkung haben. Andererseits gibt es vermutlich AT II-Amid-spaltende Enzyme, die LNA nicht angreifen. So ließe sich der Befund von Kokubu et al. (65) erklären, die aus Erythrozyten mit Hilfe von Ammoniumsulfatausfällung und anschließender Säulenchromatographie eine ATase extrahierten, die keine LAP-Aktivität zeigte.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode entwickelt, die die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Asparaginsäure bzw. Asparagin aus AT II bzw. AT II-Amid unter enzymologisch exakten Bedingungen bestimmt. Dieser Schritt stellt mit großer Wahrscheinlichkeit die geschwindigkeitslimitierende Reaktion bei der biologischen AT II-Inaktivierung im zirkulierenden Blut dar. - Einige wichtige biochemische Eigenschaften des AT II-Amid-spaltenden Enzyms wurden untersucht. Sein pH-Optimum liegt in 0,067 m Phosphatpuffer bei pH 6,4. Die Michaeliskonstante wurde mit $2,35 \times 10^{-4}$ M/l bestimmt.

Parallelbestimmungen der Blutdruckwirkung von infundiertem AT II-Amid und der Serum-ATase-Aktivität bei Gesunden und Patienten mit Hypertonus unterschiedlicher Genese ergaben keine regelhafte Beziehung zwischen den beiden Gröößen. Dieses Ergebnis macht es unwahrscheinlich, daß der AT II-Amid-Inaktivierung im strömenden Blut eine wesentliche Bedeutung für die Blutdruckwirkung dieser Substanz zukommt.

Zwei kleine Versuche mit natürlichem AT II als Substrat stützen die von mehreren Autoren geäußerte Vermutung, daß AT II und AT II-Amid durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden. - β -AT II wird durch Amino-peptidasen des menschlichen Plasmas bei pH 6,4 nicht meßbar hydrolysiert.

Der Mittelwert der ATase-Aktivität gegenüber AT II-Amid im Serum gesunder Versuchspersonen liegt bei 13,24 IE/l mit einer Standard-Abweichung von $\pm 3,72$ IE/l. Die Enzymaktivität im Serum von Patienten mit Hypertonus ('essentiell', NAS, Nierenparenchymerkrankungen) ist gegenüber der Norm nicht signifikant verändert. Dagegen finden sich bei Lebererkrankungen (Hepatitis epidemica, Lebercirrhose,

Verschlußikterus) deutlich erhöhte Serum-ATase-Aktivitäten. Bei diesen Patienten ist auch die LAP-Aktivität deutlich erhöht, die Korrelation der beiden Größen ist hochsignifikant. Bei Schwangeren im ersten und dritten Trimenon finden sich normale Serum-ATase-Aktivitäten. Dagegen ist die LAP-Aktivität im dritten Trimenon erheblich gesteigert. Diese Befunde schließen die Möglichkeit nicht aus, daß an der Inaktivierung des AT II-Amid Leucinaminopeptidasen beteiligt sind.

Die in dieser Arbeit beschriebenen klinischen Untersuchungen lassen keine Aussage darüber zu, ob der Inaktivierung des endogenen AT II im Blut eine Bedeutung für die Blutdruckregulation bei verschiedenen Krankheitszuständen zukommt. Neuere Untersuchungen verschiedener Autoren lassen jedoch vermuten, daß die Geschwindigkeit des intravasalen Abbaus von natürlichem AT II für dessen pressorische Wirkung von untergeordneter Bedeutung ist.

ANHANG: VERSUCHSPROTOKOLLE

1. a) Herstellung der Asparaginase nach A. Meister (75)

Von zehn Meerschweinchen wird durch Herzpunktion Blut gewonnen, das sofort heparinisiert und zentrifugiert wird. 30 ml Plasma werden gewonnen. Das Plasma wird mit dem gleichen Volumen einer 30%igen Na_2SO_4 -Lösung versetzt, gut gemischt und bei ca. 24°C (Zimmertemperatur) stehengelassen.

Nach 30 Minuten wird die Mischung eine halbe Stunde lang bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Präcipitat in der Hälfte des Ausgangsvolumens, das sind 15 ml kaltem aqua dest., gelöst. Die Lösung hat ein Volumen von 17,5 ml.

Dieses Präparat wird mit dem Sediment von 6 ml CaPO_4 -Gel (50 mg/ml) versetzt (Herstellung des Phosphatgels siehe 1 b), 30 Minuten bei Zimmertemperatur in einem großen Zentrifugenglas mit Gummistopfen geschüttelt und anschließend 20 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert. Das Präcipitat wird verworfen. Der Asparaginase-haltige Überstand wird in der Kühltruhe gelagert.

b) Herstellung von Phosphatgel (23)

150 ml CaCl_2 -Lösung (132 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$) werden mit Leitungswasser auf etwa 1600 ml verdünnt und mit 150 ml Na_3PO_4 -Lösung (152 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$) gemischt. Die Mischung wird mit verdünnter Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt und zentrifugiert (3000 U/min). Das Präcipitat wird viermal mit je 20 l Leitungswasser gewaschen. Anschließend wird es mit destilliertem Wasser zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts werden 5 g CaPO_4 -Gel abgewogen und im Trockenschrank zweimal 24 Stunden stehengelassen. Die Gewichts Differenz ergibt den Wassergehalt. Das Gel wird mit aqua dest. auf 50 mg Trockensubstanz/ml eingestellt.

2. Qualitative Prüfung des hergestellten Enzyms

a) Inkubation von Asparagin mit Asparaginase

2 ml eines 0,01 m Na-Boratpuffers pH 8,5 werden mit
 1 ml einer 0,04 m Asparaginlösung (Asparagin-Trockensub-
 stanz Boehringer in aqua bidest) und
 1 ml Enzymlösung im Wasserbad bei 37°C inkubiert.
 Nach 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 Minuten werden
 mit der Pipette 0,5 ml des Ansatzes entnommen (Proben 1
 bis 7) und im siedenden Wasserbad 3 Minuten erhitzt. Die
 praecipitierten Proteine werden abzentrifugiert.
 Der Leerwertansatz enthält

2 ml des 0,01 m Na-Boratpuffers pH 8,5 ,
 1 ml der 0,04 m Asparaginlösung und
 1 ml aqua bidest.

Er wird ebenso behandelt wie der Enzymansatz bis auf fol-
 gende Abweichungen: Die entnommenen Proben werden nicht
 erhitzt und nur alle 40 Minuten entnommen (Proben 8 bis
 10).

b) Papierchromatographische Trennung von Asparagin und Asparaginsäure

Auf Chromatographiepapier Schleicher und Schüll 2043 b
 werden punktförmig im Abstand von 3 cm folgende Lösungen
 aufgetragen:

0,025 ml Asparaginsäure (10,56 mg ad 2 ml a. bidest. =
 0,04 m)

0,025 ml Asparagin (10,64 mg ad 2 ml a. bidest = 0,04 m)

0,05 ml Gemisch der Asparaginsäure- und der Asparagin-
 lösung 1 + 1

0,05 ml jeder der Proben 1 bis 10.

Das beschickte Papier wird etwa 24 Stunden im Chromato-
graphiergefäß über Butanol/Eisessig/Wasser (4/1/5) äqui-
 libriert.- Die Laufzeit beträgt fünf Stunden.

Anschließend wird es im Trockenschrank 20 Minuten bei 70°C getrocknet, mit Ninhydrin entwickelt und wieder 20 Minuten bei 70°C getrocknet.

Ergebnis:

Die Proben 1 bis 3 enthalten in absteigender Konzentration Asparagin und in zunehmender Konzentration Asparaginsäure. Die Proben 4 bis 7 enthalten keine chromatographisch nachweisbaren Mengen an Asparagin und keine sichtbaren Unterschiede in ihrer Asparaginsäure-Konzentration mehr. Das bedeutet, daß bei 60 Minuten das eingesetzte Asparagin - soweit mit dieser groben Methode erfaßbar - quantitativ in Asparaginsäure umgesetzt war.

3. Versuche zur Prüfung von Reinheit und Aktivität der hergestellten Asparaginase

- a) Spaltung von Asparagin durch Enzym. Bestimmung der gebildeten Asparaginsäure im optischen Test

Substratlösung: 20 mg Asparagin-Boehringer ad 10 ml aqua bidest.

Ansatz I: 1,0 ml Boratpuffer pH 8,5
0,5 ml Enzym
0,5 ml Substratlösung

Ansatz II: 1,0 ml Boratpuffer pH 8,5
0,5 ml Enzym
0,5 ml a. bidest

Ansatz III: 1,0 ml Boratpuffer pH 8,5
0,5 ml a. bidest
0,5 ml Substratlösung

Die Ansätze werden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Von Ansatz I und II werden nach 35 Minuten (Probe 1 und 2) und nach 60 Minuten (Probe 3 und 4), von Ansatz III nach 75 Minuten (Probe 5) je 0,1 ml entnommen und sofort im

optischen Test eingesetzt. 0,1 ml des Ansatzes müssen bei quantitativer Umsetzung und genauer Substrat-Einwaage 50 γ Asparaginsäure enthalten.

Ergebnis:

Probe	ΔE	Asp.säure γ	% von 50 γ Asparaginsäure
1	0,383	46	92
3	0,374	45,3	90
2	-0,005	-	-
4	-0,003	-	-
5	-0,005	-	-

Auswertung:

Die Wiederfindung von eingewogenem Asparagin als - säure ist mit 90 bzw. 92% ausreichend hoch. Das Enzym enthält keine meßbaren Mengen Asparaginsäure oder Asparagin. Das Substrat ist ebenfalls frei von Asparaginsäure. Die Reaktion ist bereits nach 35 Minuten vollständig abgelaufen. Die Differenz zwischen 90 und 92 % muß als Ungenauigkeit der Methode gewertet werden.

b) Wiederholung des Versuchs mit Phosphatpuffer pH 7,2

Ansatz I und II je:

1,0 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2 (27)

0,5 ml Enzym

0,5 ml Substratlösung

Substratlösung und Arbeitsweise wie unter a). Einsatz von je 0,1 ml im optischen Test (Probe 1 und 2) nach 35 Minuten Inkubation.

Ergebnis:

Probe	ΔE	Asp.säure γ	% von 50 γ Asparaginsäure
1	0,397	48	96
2	0,396	48	96

Auswertung:

Die Asparaginase ist im Phosphatpuffer und bei einem pH-Wert von 7,2 ebenso aktiv wie bei dem angegebenen pH-Optimum von 8,5.

c) Bestimmung der Aktivität des Enzyms

(Es handelt sich nicht um eine im biochemischen Sinne echte Aktivitätsbestimmung, da das eingesetzte Substrat ganz umgesetzt wird. Es soll aber nicht das Enzym charakterisiert, sondern festgestellt werden, ob seine Aktivität in der hergestellten Lösung ausreichend groß ist, um auch extrem erhöhte Angiotensinase-Aktivitäten in Patientenserum zu erfassen.)

Substrat: 20 mg Asparagin-Boehringer ad 10 ml a. bidest
(2 mg/ml).

Ansatz I und II je:

0,5 ml Substrat

0,1 ml Enzym

1,4 ml 0,067 M Phosphatpuffer pH 7,2

Inkubation für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschliessend Einsatz von 0,1 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnisse:

Probe	ΔE	Asp.säure γ	% von 50 γ Asparaginsäure
1	0,398	48,0	96
2	0,395		

Auswertung:

0,1 ml Enzym setzen 1000 γ Asparagin in einer Stunde zu 96 % um. Wie später gezeigt wird, betrugen die höchsten mit der beschriebenen Methode gemessenen Angiotensinase-Werte in Patientenserum um 40 IE/l, was einer Umsetzung von etwa 30 γ Asparagin durch 0,1 ml Asparaginase entspricht. Die Aktivität der Asparaginase ist mithin ausreichend hoch.

4. Prüfung der Asparaginase auf Angiotensinase-Aktivität

Substratlösung: 2,5 mg α -L-Asp-NH₂¹-Angiotensin II (Hypertensin Ciba) ad 2 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2.

Ansatz I und II je:

- 1,0 ml Substratlösung
- 0,2 ml Enzym
- 0,2 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

Ansatz III:

- 1,2 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2
- 0,2 ml Enzym

Die Ansätze werden im Wasserbad bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Anschließend wird im optischen Test geprüft, ob die Inkubationsansätze Asparaginsäure enthalten.

Optischer Test:

- 1,0 ml des Inkubationsgemisches
- 1,86 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2
- 0,05 ml DPN·H
- 0,02 ml GOT
- 0,02 ml MDH

Nach Ablesen von E₁ Zugabe von 0,05 ml α -Ketoglutarat.

Ergebnisse:

Probe	ΔE	γ Asparaginsäure	
1	0,090	10,89	} Doppelbestimmung
2	0,092	11,12	
3	0,002	0,24	Leerwert

Auswertung:

Die Asparaginase-Lösung enthält Angiotensinase von so hoher Aktivität, daß die Testergebnisse durch sie erheblich beeinflußt werden.

5. Versuch, mit halber Enzymkonzentration zu arbeiten

Substrat I: Asparagin-Boehringer 20 mg ad 20 ml a.bidest.

Substrat II: Hypertensin-Ciba 2,5 mg ad 20 ml a. bidest.

Probe	Substr.I ml	Substr.II ml	Enzym ml	Puffer I ml	Puffer II ml	a.bid. ml
1	1,5	-	0,2	0,2	-	-
2	1,5	-	0,2	0,2	-	-
3	1,5	-	0,1	0,2	-	0,1
4	1,5	-	0,1	0,2	-	0,1
5	-	1,5	0,2	0,2	-	-
6	-	1,5	0,2	0,2	-	-
7	-	1,5	0,1	0,2	-	0,1
8	-	1,5	0,1	0,2	-	0,1
9	-	-	0,2	0,2	1,5	-
10	-	-	0,2	0,2	1,5	-
11	-	-	0,1	0,2	1,5	0,1
12	-	-	0,1	0,2	1,5	0,1

(Puffer I: 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2;

Puffer II: 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2)

Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 60 Minuten. Anschlies-
send Einsatz von 0,1 ml je Ansatz im optischen Test. Bei
vollständiger Umsetzung müßte das Ergebnis 79 γ betragen.

Ergebnis:

Probe	ΔE	γ Asp.säure	% der eingesetzten Asparaginsäure
1	0,651	78,6	99
2	0,648		
9	-0,002	-	-
10	-0,002		
3	0,535	64,7	82
4	0,535		
5	0,063	7,89	
6	0,069		
7	0,032	3,87	
8	0,033		
11	-0,004	-	-
12	-0,004		

Auswertung:

Die Angiotensinase-Aktivität ist bei halber Enzymkonzentration noch immer zu hoch, während die Asparaginase-Aktivität schon merklich reduziert ist. - Von 0,1 ml Enzym werden 750 γ Asparagin in 60 Minuten vollständig in Asparaginsäure umgesetzt, während die Umsetzung von 1500 γ Asparagin durch die gleiche Enzymmenge in 60 Minuten nicht mehr vollständig ist.

6. Versuch zur selektiven Hemmung der Angiotensinase in der Asparaginase-Lösung mit Titriplex

Substrat I: Asparagin-Boehringer 8 mg ad 150 ml a.bidest.

Substrat II: Hypertensin Ciba 2,5 mg ad 2 ml a. bidest.

T.: Titriplex-Lösung: $\text{Na}_2\text{-EdTA}$ 4×10^{-2} m (in a.bidest.)

P.: 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2

Probe	Substr.I ml	Substr.II ml	T. ml	Enzym ml	P. ml	a. bidest. ml
1	1,5	-	-	0,2	0,2	0,1
2	1,5	-	0,1	0,2	0,2	-
3	-	1,5	-	0,2	0,2	0,1
4	-	1,5	0,1	0,2	0,2	-

Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 60 Minuten. Anschließend Zugabe von 0,2 ml einer 6×10^{-2} m MgCl -Lösung je Ansatz. (Die Mg-Ionen, deren Anwesenheit für den optischen Test notwendig ist, wurden durch EdTA gebunden und müssen ersetzt werden.)

Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test (1 ml müßte 36,6 γ Asparagin enthalten).

Ergebnis:

Probe	ΔE	γ Asp.säure	% von 36,6 γ Asp.säure
1	0,290	35,1	97
2	0,273	33,0	91
3	0,036	4,36	
4	0,023	2,78	

Auswertung:

Die Asparaginase-Aktivität wird durch Titriplex nur geringfügig vermindert. - Die Angiotensinase-Aktivität wird durch Titriplex jedoch nicht genügend gehemmt. Diese verbleibende Aktivität würde die Testergebnisse noch immer zu stark beeinflussen.

7. Versuch zur selektiven Hemmung der Angiotensinase in der Asparaginase-Lösung mit Cadmium-Ionen

5 ml Enzym werden zweimal 24 Stunden und noch einmal 14 Stunden gegen 1 l a. bidest. dialysiert. Das ausgefallene Protein wird durch Zugabe von etwas festem NaCl wieder in Lösung gebracht (ergibt 6,4 ml). Die Lösung wird mit 0,5 ml einer 0,15 m Cadmiumchlorid-Lösung versetzt (14 mg CdCl_2 ad 5 ml a. bidest.) und für 60 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Konzentration des CdCl_2 in der Enzym-Lösung entspricht einer 10^{-3} m Lösung. Anschließend wird ein ml eines 0,067 m Phosphatpuffers hinzugegeben, die Lösung für eine Stunde in den Kühlschrank gestellt und dann bei 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert, um das entstandene $\text{Cd}(\text{PO}_4)_2$ abzutrennen. Der Überstand, das mit Cadmium behandelte Enzym, wird auf Asparaginase- und Angiotensinase-Aktivität getestet.

Substrat I: 20 mg Asparagin-Boehringer ad 10 ml a. bidest

Substrat II: 2,5 mg Hypertensin Ciba ad 2 ml a. bidest.

	Probe	Substrat I	Substrat II	Enzym	Puffer I	Puffer II	a.bid.
		ml	ml	ml	ml	ml	ml
1		0,5	-	0,5	-	1,0	-
2		0,5	-	0,5	-	1,0	-
3		-	-	0,5	-	1,0	0,5
4		-	1,0	0,2	0,2	-	-
5		-	1,0	0,2	0,2	-	-
6		-	-	0,2	0,2	1,0	-

(Puffer I: 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2;

Puffer II: 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2)

Inkubation für 60 Minuten im Wasserbad bei 37°C. Anschliessend Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Probe	ΔE	γ Asp.säure
1	0,039	4,72
2	0,039	
3	-0,005	-
4	-0,006	-
5	-0,006	-
6	-0,005	-

Auswertung:

Die Angiotensinase-Aktivität wird zwar durch Cadmium vollständig gehemmt, jedoch wird die Asparaginase-Aktivität ebenfalls fast vollständig gehemmt.

8. Versuch, die Angiotensinase durch Ansäuerung zu hemmen

Je 2 ml Enzym werden mit n/10 HCl auf einen pH-Wert von 3,8 (Probe I), 3,6 (Probe II), 3,2 (Probe III) eingestellt und für 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Anschließend werden die Proben mit n/10 NaOH wieder neutralisiert (pH 7,2) und auf ihre Enzymaktivitäten getestet. Substrat I (S I): Asparagin-Roehringer 8 mg ad 150 ml

a. bidest.

Substrat II (S II): Hypertensin Ciba 2,5 ml ad 2 ml aque

bidest.

Puffer I (P I): 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2

Puffer II (P II) 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

Probe	Ansatz	S I ml	S II ml	Enzym ml	P I ml	P II ml
I	1	1,5	-	0,2	0,2	-
	2	-	1,5	0,2	0,2	-
	3	-	-	0,2	0,2	1,5
II	4	1,5	-	0,2	0,2	-
	5	-	1,5	0,2	0,2	-
	6	-	-	0,2	0,2	1,5
III	7	1,5	-	0,2	0,2	-
	8	-	1,5	0,2	0,2	-
	9	-	-	0,2	0,2	1,5

Inkubation für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschliessend Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	Asp.säure γ	% von 42 γ Asparaginsäure
1	0,112	13,55	32
2	-0,029	-	
3	-0,014	-	
4	0,016	1,94	4,4
5	-0,033	-	
6	-0,007	-	
7	-0,001	-	-
8	-0,024	-	
9	-0,008	-	

Auswertung:

Bereits die Ansäuerung auf einen pH-Wert von 3,8 hat die Aktivität der Angiotensinase vollständig, die der Asparaginase jedoch ebenfalls erheblich gehemmt.

9. Versuch, die Angiotensinase aus der Asparaginase-Lösung durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat zu eliminieren

a) Fraktionierung und orientierende Aktivitätsmessung

4 ml Enzymlösung werden durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nacheinander auf 25 % (Fraktion I) und 35 % (Fraktion II) Ammon-sulphatkonzentration gebracht. Nach jedem der beiden Schritte wird die Lösung 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt und das Praecipitat anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Praecipitat wird in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und gegen ebenfalls 0,9%ige NaCl-Lösung 24 Stunden lang dialysiert.

Aktivitätsbestimmung:

Substrat I (S I): Asparagin-Boehringer 8 mg ad 150 ml aqua
bidest.

Substrat II (S II): Hypertensin Ciba 2,5 mg ad 2 ml a.bid.

P I: 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2

P II: 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2

Fraktion	Ansatz	S I ml	S II ml	Enzym ml	P I ml	P II ml
I	1	1,5	—	0,2	0,2	—
	2	—	1,5	0,2	0,2	—
	3	—	—	0,2	0,2	1,5
II	4	1,5	—	0,2	0,2	—
	5	—	1,5	0,2	0,2	—
	6	—	—	0,2	0,2	1,5

Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 60 Minuten. Anschlies-send Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Fraktion	Ansatz	ΔE	Asp.säure	% von 42 r Asparaginsäure
I	1	0,355	42,9	102
	2	-0,023	—	
	3	-0,009	—	
II	4	0,051	6,2	1/2
	5	-0,019	—	
	6	-0,009	—	

Auswertung:

Fraktion I (mit 25 % Substratsättigung ausgefällt) zeigt unverminderte Asparaginase-Aktivität, während die Angiotensinase-Aktivität aus dieser Fraktion vollständig eliminiert ist.

b) Genaue Prüfung des mit 25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ präcipitierten Enzyms und Vergleich mit der Enzym-Ausgangslsg.

Substrate I und II sowie Puffer I und II wie unter a).

Ansatz	S I	S II	P I	P II	Enzym-Ausgangslsg.	Enzym Frakt. I
	ml	ml	ml	ml	ml	ml
1	1,5	-	0,2	-	0,2	-
2	1,5	-	0,2	-	0,2	-
3	-	1,5	0,2	-	0,2	-
4	-	1,5	0,2	-	0,2	-
5	-	-	0,2	1,5	0,2	-
6	1,5	-	0,2	-	-	0,2
7	1,5	-	0,2	-	-	0,2
8	-	1,5	0,2	-	-	0,2
9	-	1,5	0,2	-	-	0,2
10	-	-	0,2	1,5	-	0,2

Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 60 Minuten. Anschließend Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	Asp.gäure 0	% von 42 % Asparaginsäure
1	0,338	40,90	97
2	0,342	41,38	98
3	0,066	7,97	
4	0,066	7,97	
5	-0,006	-	
6	0,338	40,90	97
7	0,338	40,90	97
8	-0,001	-	
9	-0,003	-	
10	-0,006	-	

Auswertung:

Die Asparaginase-Aktivität der Fraktion II ist unvermindert, während ihre ATase-Aktivität vollständig eliminiert ist.

10. Versuch, die Abhängigkeit der Asparaginhydrolyse durch Asparaginase von der Inkubationszeit zu bestimmen

Substrat: 26,6 mg Asparagin-Boehringer ad 50 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2 (532 /ml)

Enzym: Fraktion II der Asparaginase verdünnt 1 + 49 mit 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

Ansätze 1 - 4: 9 ml Substratlösung und 1 ml Enzymlösung werden gemischt und auf 4 Röhrchen verteilt. Ansätze 5 und 6: 9 ml Puffer und 1 ml Enzymlösung werden gemischt und auf 2 Röhrchen verteilt. Ansätze 7 und 8: 10 ml Substratlösung werden auf 2 Röhrchen verteilt.

Es wird angenommen, daß bei dieser hohen Asparaginkonzentration Substratsättigung herrscht. In jedem Fall wird bei so starker Verdünnung des Enzyms auch nach 60 Minuten Inkubation so wenig Substrat verbraucht, daß die Enzym-Substrat-Reaktion mit praktisch gleichbleibender Geschwindigkeit abläuft.

Inkubation für 15 Min. (Ansatz 1), 30 Min. (Ansatz 2, 5 und 7), 45 Min. (Ansatz 3), 60 Min. (Ansatz 4, 6 und 8) bei 37°C im Wasserbad. Anschließend Einsatz von je 1,0 ml in optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	Ansatz	ΔE
1	0,055	5	-0,005
2	0,110	6	-0,004
3	0,172	7	0,000
4	0,227	8	0,000

Auswertung:

Es besteht eine lineare Beziehung zwischen Inkubationszeit und freigesetzter Asparaginsäure. Sowohl das Substrat als auch das Enzym sind frei von Asparaginsäure.

11. Herstellung von Hilfssubstanzen für den optischen Test in seiner endgültigen Form und für die Inkubationsschritte

a) DPNH·Na₂-Lösung: 20 mg Trockensubstanz-Boehringer ad 2 ml a. bidest.

b) α-Ketoglutarat-Lösung (0,1 m): 0,146 g Na-α-Ketoglutarat-Trockensubstanz-Boehringer werden ad 5 ml in a. bidest. durch leichtes Erwärmen im Wasserbad gelöst. Der pH-Wert wird mit 2n NaOH-Lösung auf 7,2 eingestellt und die Lösung ad 10 ml mit a. bidest. aufgefüllt.

c) MDH-Suspension (2,5 mg/ml): 0,125 ml MDH-Suspension-Boehringer (25 mg Protein/2,5 ml 2,8 m Ammoniumsulfatlösung) werden mit 0,375 ml einer 2,8 m Ammoniumsulfatlösung verdünnt.

d) GOT-Suspension (2,5 mg/ml): 0,125 ml GOT-Suspension-Boehringer (10 mg Protein/ml 1,6 m Ammoniumsulfatlösung) werden mit 0,375 ml einer 1,6 m Ammoniumsulfatlösung verdünnt.

e) Phosphatpuffer 0,067 m, pH 7,2 (nach Soerensen²⁷): 36 ml einer Na₂HPO₄·2H₂O-Lösung (1,1876 g Trockensubstanz ad 100 ml a. bidest.) werden mit 14 ml einer KH₂PO₄-Lösung (0,9078 g Trockensubstanz ad 100 ml a. bidest) gemischt.

f) Phosphatpuffer 0,67 m, pH 7,2 (nach Soerensen²⁷): 71,5 ml einer Na₂HPO₄·2H₂O-Lösung (11,88 g Trockensubstanz ad 100 ml a. bidest.) werden mit 28,5 ml einer KH₂PO₄-Lösung (9,08 g Trockensubstanz ad 100 ml a. bidest. gemischt.

Die Substanzen werden in der Tiefkühltruhe gelagert.

12. Endgültige Form der Asparaginase-Herstellung (Nach A. Meister⁷⁵, modifiziert aufgrund der Vorversuche)

a) Herstellung der Asparaginase

10 mit Nembutal narkotisierte Meerschweinchen werden durch Herzpunktion entblutet. Das Blut wird heparinisiert. Anschließend wird 20 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird mit 40 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung versetzt und noch einmal für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand beträgt 118 ml. Dieser wird mit 30 %iger (Gewicht/Volumen) Na_2SO_4 -Lösung (54 ml aqua bidest. + 27 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Trockensubstanz) leicht geschüttelt und bei Zimmertemperatur eine Stunde stehengelassen. Anschließend wird 30 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Das Praecipitat wird in 100 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und in zwei Dialyseschläuchen vier Tage lang gegen mehrere Wechsel 0,9 %iger NaCl-Lösung dialysiert. Endvolumen: 116 ml.

Fraktionierung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

Fraktion I: (15 % Substratsättigung): 18,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Trockensubstanz werden zu der Asparaginase-Lösung aus Meerschweinchenserum im Eisbad zugegeben. Die kalte Lösung wird bis zur Lösung des Ammoniumsulfat gerührt und 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wird 25 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, das Sediment in 50 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und 24 Stunden gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert. Anschließend Lagerung in der Tiefkühltruhe bei -20°C .

Fraktion II (25 % Substratsättigung): Der Überstand von Fraktion I (123 ml) wird mit 12,3 g Ammoniumsulfat-Trockensubstanz versetzt. Weitere Behandlung wie bei Fraktion I.

Fraktion III (35 % Substratsättigung): Der Überstand von Fraktion II (119 ml) wird mit 11,9 g Ammoniumsulfat-Trockensubstanz versetzt. Weitere Behandlung wie bei Fraktion I.

Fraktion IV (45 % Substratsättigung): Der Überstand von Fraktion III (119ml) wird mit 11,9 g Ammoniumsulfat-Trockensubstanz versetzt. Weitere Behandlung wie bei Fraktion I.

Fraktion V (60 % Substratsättigung): Der Überstand von Fraktion IV (120 ml) wird mit 18 g Ammoniumsulfat-Trockensubstanz versetzt. Weitere Behandlung wie Fraktion I.

b) Testung der Enzymfraktionen auf Angiotensinase-Aktivität

Substrat: 2,5 mg Hypertensin Ciba ad 2 ml a. bidest.

P I bzw. II: 0,67 m bzw. 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

Ansatz	Substrat ml	Enzym ml	P I ml	P II ml
1	1,5	(15%) 0,2	0,2	-
2	1,5	(25%) 0,2	0,2	-
3	1,5	(35%) 0,2	0,2	-
4	1,5	(45%) 0,2	0,2	-
5	1,5	(60%) 0,2	0,2	-
6	1,5	-	0,2	0,2
7	-	(15%) 0,2	0,2	1,5
8	-	(25%) 0,2	0,2	1,5
9	-	(35%) 0,2	0,2	1,5
10	-	(45%) 0,2	0,2	1,5
11	-	(60%) 0,2	0,2	1,5

Inkubation für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad, anschließend 5 Minuten Erhitzen im kochenden Wasserbad. Dann Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	γ Asparaginsäure	Ansatz	ΔE	γ Asparaginsäure
1	-0,002	-	7	-0,002	-
2	0,001	-	8	-0,002	-
3	0,061	7,38	9	0,000	-
4	-0,002	-	10	-0,001	-
5	0,001	-	11	0,002	-
6	-0,001	-			

Auswertung:

Angiotensinase findet sich in meßbarer Aktivität nur in der mit 35 % Substratsättigung ausgefällten Fraktion.

c) Nochmalige Testung der Enzymfraktionen II und III
auf Angiotensinase-Aktivität mit Doppelbestimmungen

Substrat: 2,5 mg Hypertensin Ciba ad 2 ml a. bidest.

Puffer: 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2

Ansatz	Substrat ml	Puffer ml	Enzym Fr.II ml	Enzym Fr.III ml
1	1,5	0,2	0,2	-
2	1,5	0,2	0,2	-
3	1,5	0,2	-	0,2
4	1,5	0,2	-	0,2

Inkubation für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschlies-
send Einsatz von je 1,0 ml pro Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	γ Asparaginsäure
1	0,002	0,24
2	0,003	0,36
3	0,062	7,44
4	0,061	

Auswertung:

Die Angiotensinase-Aktivität in Fraktion II ist minimal
und kann vernachlässigt werden; das Ferment findet sich
überwiegend in Fraktion III.

d) Testung der Enzymfraktionen auf Asparaginase-Akti-
vität

Substrat: 20 mg Asparagin-Boehringer ad 10 ml a. bidest.

Puffer: 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

Ansatz	Substrat ml	Puffer ml	Enzym ml
1	0,5	1,4	(15%) 0,1
2	0,5	1,4	(25%) 0,1
3	0,5	1,4	(35%) 0,1
4	0,5	1,4	(45%) 0,1
5	0,5	1,4	(60%) 0,1

Inkubation für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschlies-
send Einsatz von 0,1 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	γ Asp. säure	% von 50 γ Asparaginsäure
1	0,017	2,0	4
2	0,394	47,7	95,4
3	0,117	14,0	28
4	0,001	-	-
5	0,001	-	-

Auswertung:

Die Hauptkonzentration der Asparaginase findet sich in Fraktion II.

Von 0,1 ml Enzym werden in einer Stunde 1000 γ Asparagin zu rund 95 % hydrolysiert. Das entspricht den Ergebnissen der Versuche 3. und 5. Die Aktivität des Enzyms reicht aus, um auch extrem erhöhte ATase-Aktivitäten in Patientenseren zu bestimmen. (Es wurde bereits gesagt, daß es sich hier nicht um eine echte Aktivitätsbestimmung der Asparaginase handelt. Die Asparaginase wurde nur im Hinblick auf die Erfordernisse der ATase-Bestimmung geprüft.)

- e) Doppelbestimmungen der ATase-Aktivität in Patientenseren zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

Die Messungen wurden an hämolysefreiem Serum von Normotonikern und Leberkranken vorgenommen. Die praktische Ausführung entspricht der Beschreibung unter D.I.4.

Ergebnis:

ATase-Aktivität (IE/l)		ATase-Aktivität (IE/l)	
1.	15,46	7.	12,14
	15,46		11,04
2.	20,97	8.	11,57
	20,97		9,38
3.	30,94	9.	12,70
	31,65		11,22
4.	30,54	10.	17,11
	30,54		16,93
5.	8,83	11.	24,66
	9,38		23,18
6.	35,88		
	34,96		

Berechnung der Abweichung vom Mittelwert:

$$\sigma = \sqrt{\frac{3,02 - (18,49:11)}{10}} = 0,37$$

MW (1/2 Diff.) = 0,39

$$((x = 4,3 \quad x^2 = 3,02 \quad (x)^2 = 18,49 \quad n = 11))$$

Die Abweichung vom Mittelwert der Doppelbestimmungen beträgt $0,39 \pm 0,37$ IE/l.

13. Biochemische Daten der Angiotensinase

a) Bestimmung der Michaeliskonstante

Substratverdünnung (Hypertensin Ciba) in 0,067 m Phosphatpuffer pH 6,4:

1.	$1,6 \times 10^{-3}$ m	5.	$6,7 \times 10^{-5}$ m
2.	8×10^{-4} m	6.	$3,35 \times 10^{-5}$ m
3.	4×10^{-4} m	7.	$1,34 \times 10^{-5}$ m
4.	$1,33 \times 10^{-4}$ m	8.	(Leerwert)

Ansätze 1 - 7: 1,5 ml Substratlösung in Konzentrationen von $1,34 \times 10^{-5}$ bis $1,6 \times 10^{-3}$ m.

0,5 ml Serum (Mischserum 1 + 1 verdünnt mit 0,9 %iger NaCl-Lösung)

Ansatz 8: 1,5 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 6,4
0,5 ml Mischserum 1 + 1 verdünnt.

Inkubation für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Sofort anschließend Zugabe von 0,2 ml 5n HClO_4 zu jedem Ansatz, 15 Minuten zentrifugieren bei 3000 U/min. Der Überstand wird abpipettiert und mit 5n KOH neutralisiert (pH 7,2). Dann werden 1,5 ml von jedem Ansatz mit

0,2 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2 und
0,2 ml Asparaginase (Fraktion II)

für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	χ Asparaginsäure
1	0,066	7,99
2	0,058	7,02
3	0,049	5,93
4	0,026	3,15
5	0,017	2,06
6	0,007	0,85
7	-0,001	-
8	-0,001	-

Berechnung (anhand der graphischen Darstellung):

$$-\frac{1}{K} = -4300 \quad K = \frac{1}{4,3} \times 10^{-3} = 2,3 \times 10^{-4} \text{ M/l}$$

(Zur Ermittlung der Michaeliskonstante nach der Methode von Lineweaver und Burk²⁶ werden die Beziehungen der reziproken Substratkonzentrationen und der reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten graphisch dargestellt. Man erhält eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der x-Achse den negativen reziproken Wert der gesuchten Konstante ($-\frac{1}{K}$) darstellt.

b) Bestimmung des pH-Optimums der Angiotensinase

Hämolysefreies Mischserum von gesunden Versuchspersonen wird mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt 1 + 4 .

Puffer: 0,067 m Phosphatpuffer, pH-Werte im Abstand von 0,4 pH-Einheiten von pH 5,2 bis pH 8,0

Substrat: 2,5 mg Hypertensin Ciba gelöst ad 3 ml in Phosphatpuffer pH 5,2 bis pH 8,0

Ansätze 1 - 8: 0,5 ml verdünntes Serum

1,5 ml Substrat-Puffer-Lösung (pH 5,2 - pH 8)

Ansätze I - VIII: 0,5 ml verdünntes Serum

(Leerwerte) 1,5 ml Puffer (pH 5,2 bis pH 8,0)

Inkubation für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Sofort anschließend Zugabe von 0,2 ml 3n HClO₄ je Ansatz zur Beendigung der Reaktion. Zentrifugation für 10 Minuten bei 3000 U/min. dann Neutralisierung des Überstandes mit 3n KOH (Kontrolle mit Universalindikatorpapier). Anschließend Zugabe von

0,2 ml Asparaginase (Fraktion II) und

0,2 ml 0,67 m Phosphatpuffer pH 7,2 zu

1,5 ml je Ansatz.

Zweite Inkubation für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad. Anschließend Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis: pH-Wert	Ansatz	ΔE	$\Delta E_{\text{kor.}}$	χ Asp.säure
5,2	1	0,049		
	I	-0,006	0,054	6,53
5,6	2	0,053		
	II	-0,005	0,058	7,02
6,0	3	0,060		
	III	-0,004	0,064	7,74
6,4	4	0,062		
	IV	-0,006	0,068	8,23
6,8	5	0,060		
	V	-0,001	0,061	7,38
7,2	6	0,059		
	VI	-0,003	0,062	7,50
7,6	7	0,057		
	VII	-0,003	0,060	7,26
8,0	8	0,057		
	VIII	-0,004	0,061	7,38

Auswertung:

Das pH-Optimum liegt nach dem Ergebnis dieses Versuchs bei pH 6,4. Die Kurve verläuft jedoch so flach, daß eine Wiederholung mit größerer Angiotensinase-Aktivität und für einen größeren pH-Bereich notwendig ist.

c) Wiederholung des Versuchs zur Bestimmung des pH-Optimums

Arbeitsweise wie unter b) bis auf folgende Abweichungen:

1. Verdünnung des Mischserums mit 0,9 %iger NaCl-Lösung 1+1;
2. pH-Reihe der Puffer: im Abstand von ca. 0,4 pH-Einheiten
 von pH 3,6 bis pH 5,2: 0,1 m Essigsäure-Acetat-Puffer
 von pH 5,2 bis pH 7,6: 0,067 m Phosphatpuffer
 von pH 7,6 bis pH 9,0: 0,05 m Tris-HCl-Puffer

Ansätze 1-14: 0,5 ml Mischserum

1,5 ml Substrat-Puffer (2,5 mg Hypertensin
Ciba ad 2 ml Puffer pH 3,6 - pH 9,0)

Ansätze I - XIV: 0,5 ml Mischserum

1,5 ml Puffer pH 3,6 - pH 9,0

Ergebnis des optischen Tests:

pH-Wert	Ansatz	ΔE	ΔE_{korrr}	γ Asp.säure
3,6	1	-0,008	-	-
	I	-0,014		
4,0	2	-0,003	-	-
	II	-0,011		
4,6	3	0,007	0,004	0,48
	III	-0,003		
5,2	4	0,014	0,013	1,57
	IV	-0,001		
5,2	5	0,051	0,048	5,81
	V	-0,003		
5,6	6	0,057	0,049	5,93
	VI	-0,008		
6,0	7	0,061	0,055	6,65
	VII	-0,006		
6,4	8	0,062	0,060	7,26
	VIII	-0,002		
6,8	9	0,057	0,052	6,29
	IX	-0,005		
7,2	10	0,050	0,042	5,08
	X	-0,008		
7,6	11	0,046	0,042	5,08
	XI	-0,004		
7,6	12	0,051	0,045	5,45
	XII	-0,006		
8,6	13	0,060	0,063	7,62
	XIII	0,003		
9,0	14	0,059	0,056	6,78
	XIV	-0,003		

Auswertung:

Das pH-Optimum der Angiotensinase wird wieder bei pH 6,4 gefunden (in Phosphatpuffer). Ein zweiter Aktivitätsgipfel liegt bei pH 8,6 (in Trispuffer). Es ist nicht sicher, ob es sich hier um ein zweites Enzym handelt oder ob sich das pH-Optimum der Angiotensinase in diesem Puffer weiter im alkalischen pH-Bereich findet. Die Annahme zweier Enzyme ist wahrscheinlich.

14. Vergleich des natürlichen Angiotensin II mit dem Angiotensin II - Amid (Hypertensin Ciba)

a) Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeiten beider Substrate durch menschliches Serum

Sr I: Mischserum von gesunden Versuchspersonen unverdünnt

Sr II: Sr I verdünnt mit 0,9 %iger NaCl-Lösung 1 + 1

S I A: 3,2 mg α -L-Asp¹-Angiotensin II in 2,5 ml 0,067 m
Phosphatpuffer pH 6,4

S I H: 5,0 mg Hypertensin Ciba in 4 ml 0,067 m Phosphat-
puffer pH 6,4

S II A: 3,2 mg α -L-Asp¹-Angiotensin II in 2,5 ml 0,067 m
Phosphatpuffer pH 7,2

S II H: 5,0 mg Hypertensin Ciba in 4 ml 0,067 m Phosphat-
puffer pH 7,2

NaCl: 0,9 %iger NaCl-Lösung

Ansatz	Sr I ml	Sr II ml	NaCl ml	S I A ml	S I H ml	S II A ml	S II H ml
1	-	0,5	-	-	-	-	1,5
2	-	0,5	-	-	1,5	-	-
3	0,34	-	-	-	-	1,0	-
4	0,34	-	-	1,0	-	-	-
5	-	-	0,5	-	-	-	1,5
6	-	-	0,5	-	1,5	-	-
7	-	-	0,34	-	-	1,0	-
8	-	-	0,34	1,0	-	-	-

Inkubation für 120 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschliessend Behandlung wie bei Versuch 13., abgesehen davon, daß nach der Neutralisierung, vor der zweiten Inkubation, zu den Ansätzen 3, 4, 7 und 8 keine Asparaginase und kein konzentrierter Puffer gegeben werden. Bei der zweiten Inkubation werden jeweils 1,0 ml des ersten Inkubationsansatzes eingesetzt.

Ergebnis des optischen Tests:

Ansatz	ΔE	ΔE_{korrr}	γ Asp.säure
1	0,072		
5	0,008	0,064	7,74
2	0,090		
6	0,007	0,038	10,04
3	0,023		
7	-0,003	0,026	3,14
4	0,011		
8	-0,004	0,015	1,82

Berechnung für α -L-Asp¹-AT II:

Von 1,74 ml Ansatz wurden 1,0 ml für den optischen Test entnommen. Das Ergebnis muß also mit 1,74 multipliziert werden.

Ansatz 3: $3,14 \times 1,74 = 5,46 \gamma$

Ansatz 4: $1,86 \times 1,74 = 3,13 \gamma$

Diese Ansätze enthielten je 0,34 ml Serum. Umgerechnet auf 0,5 ml Serum im 2 ml-Ansatz:

Ansatz 3: $8,19 \gamma$

Ansatz 4: $4,70 \gamma$

Berechnung für Hypertensin Ciba:

Von 2,4 ml Ansatz wurden 1,0 ml für den optischen Test entnommen. Beim zweiten Inkubationsschritt wurde diese Menge noch einmal mit 0,4 ml verdünnt. Die Ergebnisse müssen also mit $1,4 \times 2,4$ multipliziert werden.

Ansatz 1: $7,74 \times 1,4 \times 2,4 = 26,02 \gamma$

Ansatz 2: $10,04 \times 1,4 \times 2,4 = 33,74 \gamma$

Diese Ansätze enthielten 0,25 ml Serum. Umgerechnet auf 0,5 ml Serum im 2 ml-Ansatz:

Ansatz 1: $52,04 \gamma$

Ansatz 2: $67,48 \gamma$

Zusammenfassung:

In 2 Stunden wurden von 0,5 ml Serum in einem Ansatz von

2 ml bei 37 C die folgenden Mengen Asparaginsäure freigesetzt:

<u>Substrat</u>	<u>pH 6,4</u>	<u>pH 7,2</u>
α -L-Asp ¹ -AT II	4,70 γ	8,19 γ
Hypertensin Giba	67,48 γ	52,05 γ

b) Gemeinsame Inkubation von natürlichem Angiotensin II
und Hypertensin Ciba

Mit diesem Versuch soll geprüft werden, ob eine Inhibierung der Spaltung des einen Peptids durch die Anwesenheit des anderen erfolgt.

S I: 10 mg Hypertensin Ciba ad 5 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

S II: 6,6 mg α -L-Asp¹-Angiotensin II ad 3,3 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

S III: 12 mg Hypertensin Ciba + 12 mg α -L-Asp¹-Angiotensin II ad 6 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 7,2

Sr: Mischserum von gesunden Versuchspersonen (unverdünnt)

NaCl: 0,9 %ige NaCl-Lösung

Ansatz	Sr ml	NaCl ml	S I ml	S II ml	S III ml
1	0,5	-	1,5	-	-
2	0,5	-	1,5	-	-
3	-	0,5	1,5	-	-
4	0,5	-	-	1,5	-
5	-	0,5	-	1,5	-
6	1,0	-	-	-	3,0
7	-	1,0	-	-	3,0

Inkubation für 120 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschließend Praecipitation mit 0,2 ml 5n HClO₄ je 0,5 ml Serum, Zentrifugation für 15 min. bei 3000 U/min und Neutralisierung mit 0,2 ml 5n KOH je 0,5 ml Serum (Prüfung mit Universalindikatorpapier).

Von Ansatz 4,5,6 und 7 werden je 1,0 ml entnommen und sofort im optischen Test auf ihren Asparaginsäuregehalt geprüft (= Probe 4,5,6a und 7a).

Die Ansätze 1,2,3 und je 1,0 ml der Ansätze 6 und 7 werden mit Asparaginase inkubiert (Behandlung s. Versuch 13). Einsatz von 1,0 ml je Ansatz im optischen Test.

Ergebnis:

Ansatz	ΔE	ΔE_{korr}	γ Asp.säure
4	0,038		
5	-0,009	0,047	5,69
6a	0,023		
7a	-0,006	0,029	3,51
1	0,128		
2	0,129	0,129	15,61
3	0,000		
6	0,030		
7	0,007	0,023	2,78

Berechnung:

Für Ansatz 1: $\frac{15,61 \times 1,9 \times 2,4}{1,5} = 23,6 \gamma$

Für Ansatz 4: $5,69 \times 2,4 = 13,67 \gamma$ (Umsetzung aus natürlichem AT II allein)

Ansatz 1 umgerechnet auf 0,5 ml Serum:

$23,6 \times 2 = 47,2 \gamma$ (Umsetzung aus Hypertensin allein)

Für Ansatz 6a: $3,51 \times 4,8 = 16,85 \gamma$

Für Ansatz 6: $2,78 \times 1,4 \times 4,8 = 18,7 \gamma$

Umgerechnet auf 0,5 ml Serum in 2 ml Ansatz:

Ansatz 6a: $16,85 \times 0,5 = 8,43 \gamma$ (Umsetzung aus natürlichem AT II im Mischansatz)

Ansatz 6: $18,7 \times 0,5 = 9,35 \gamma$ (Umsetzung aus beiden Substraten im Mischansatz)

$9,35 - 8,43 = 0,92 \gamma$ (Umsetzung aus Hypertensin im Mischansatz)

Zusammenfassung:

Von 0,5 ml Serum wurden im 2 ml-Ansatz in 2 Stunden bei pH 7,2 und 37°C in den 3 Ansätzen folgende Mengen Asparagin bzw. Asparaginsäure gebildet:

1. Aus Hypertensin Ciba allein:	47,2 γ
2. Aus α -L-Asp ¹ -AT II allein:	13,67 γ
Hypertensin Ciba	1,16 γ
3. Aus plus	
α -L-Asp ¹ -AT II	6,62 γ

15. Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeit von α -L-AT II-Amid und β -L-AT II durch menschliches Serum

Sr I: Menschliches Mischserum unverdünnt

Sr II: Menschliches Mischserum verdünnt mit 0,9 %iger NaCl-Lösung 1 + 1

S H : 2,5 mg Hypertensin Ciba ad 2 ml Phosphatpuffer pH 7,2 (0,067 m)

S A : 2,5 mg β -L-AT II ad 2 ml Phosphatpuffer pH 7,2

Ansatz	Sr I ml	Sr II ml	S H ml	S A ml	NaCl ml	Inkub.zeit min
1	-	0,5	1,5	-	-	30
2	-	-	1,5	-	0,5	30
3	-	0,5	1,5	-	-	60
4	-	-	1,5	-	0,5	60
5	-	0,5	1,5	-	-	120
6	-	-	1,5	-	0,5	120
7	-	0,5	1,5	-	-	180
8	-	-	1,5	-	0,5	180
9	0,5	-	-	1,5	-	120
10	-	-	-	1,5	0,5	120
11	0,5	-	-	1,5	-	240
12	-	-	-	1,5	0,5	240
13	0,5	-	-	1,5	-	360
14	-	-	-	1,5	0,5	360

Inkubation für die jeweils angegebene Zeit bei 37°C im Wasserbad, anschließend Behandlung wie im Versuch 13.

Ergebnis des optischen Tests:

Ansatz	ΔE	$\Delta E_{\text{korr.}}$	Asp.säure γ	Umrechnung auf 0,5 ml Serum in 2 ml Ansatz
1	0,042			
2	0,017	0,025	3,0	20,16 γ
3	0,069			
4	0,015	0,054	6,2	41,66 γ
5	0,111			
6	0,016	0,095	11,4	
7	0,110			
8	0,010	0,100	12,0	76,60 γ
9	0,004			
10	0,004	-		
11	0,005			
12	0,002	-		
13	0,002			
14	0,004	-		

Auswertung:

AT II-Amid (Hypertensin Ciba) wird durch menschliches Serum schnell gespalten; β -L-AT II wird durch menschliches Serum nicht meßbar angegriffen.

Abbildungen

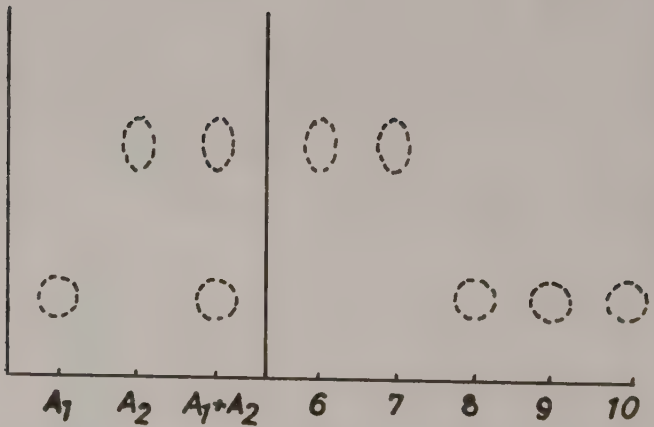
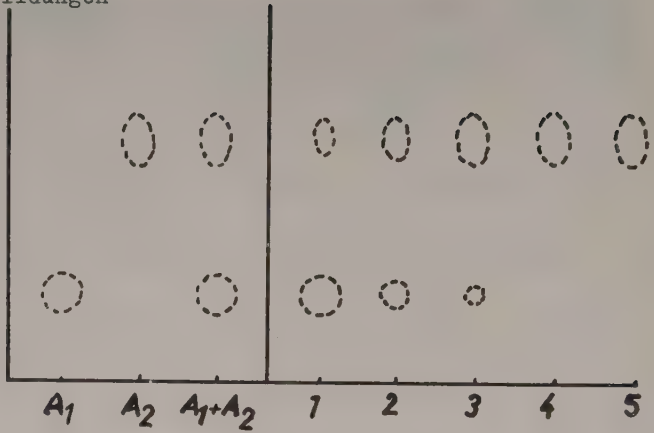


Abb. 1.
Qualitative Prüfung der Asparaginase-Aktivität:
Schematische Skizze des Papierchromatogramms.

A_1 = Asparagin; A_2 = Asparaginsäure.

Erläuterungen s. S. 71 f.

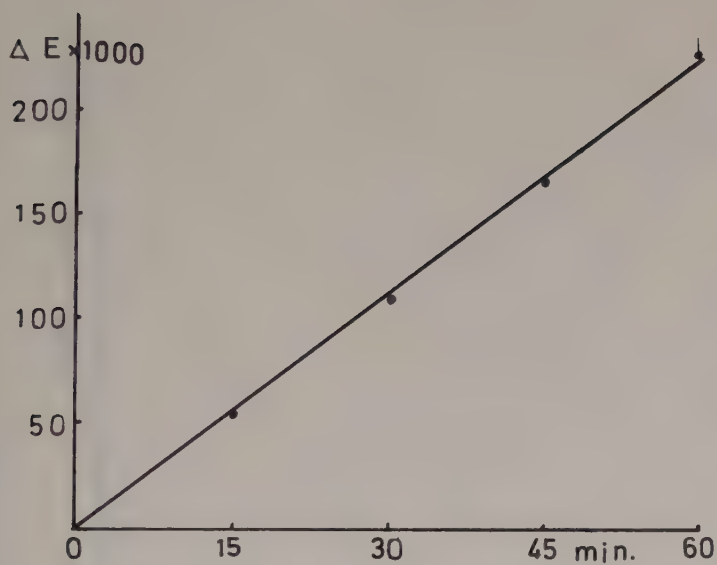


Abb. 2.

Abhängigkeit der Asparagin-Hydrolyse durch Asparaginase von der Inkubationszeit

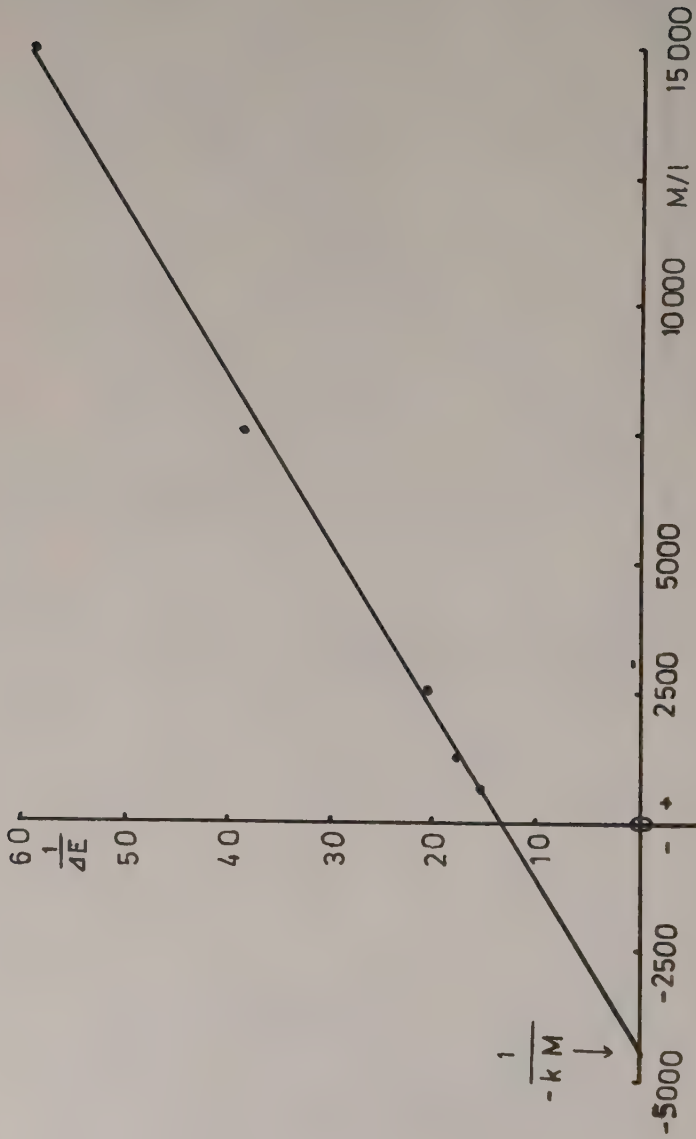


Abb. 3. Bestimmung der Michaeliskonstante der ATase

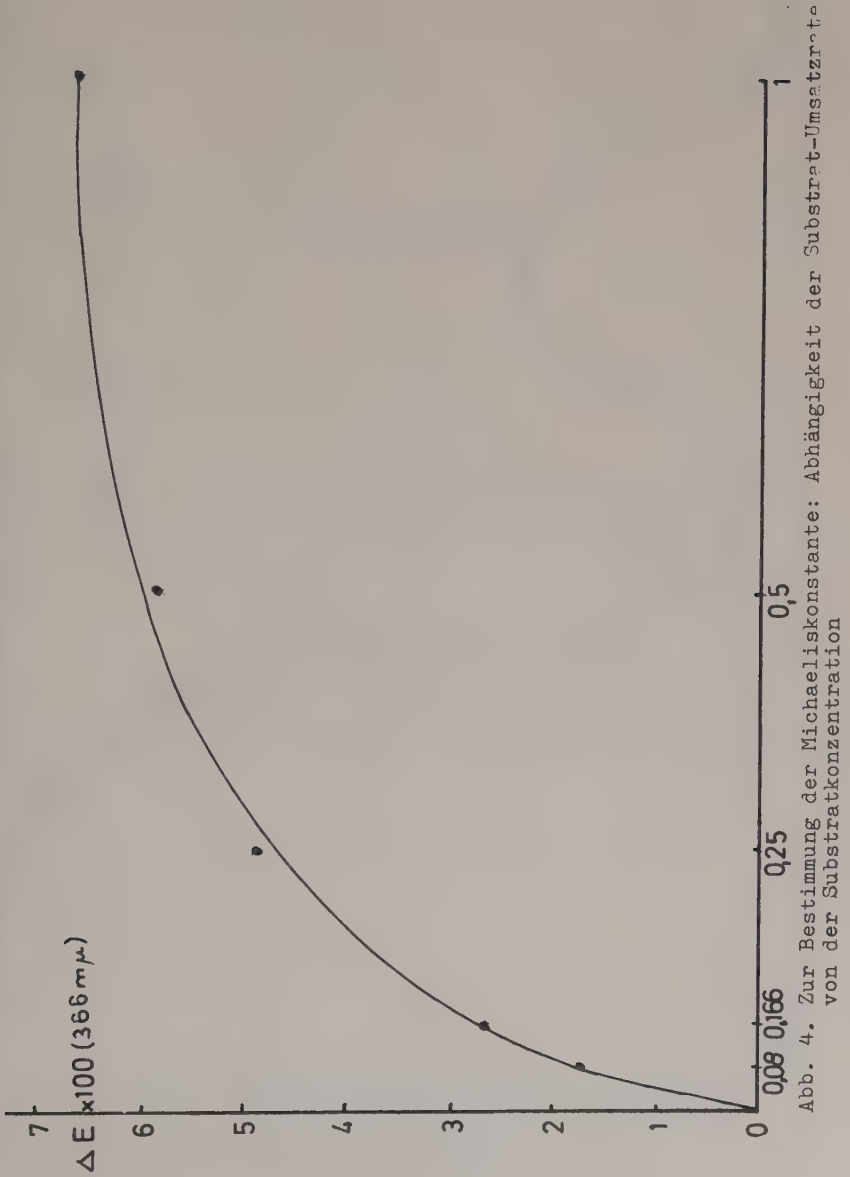
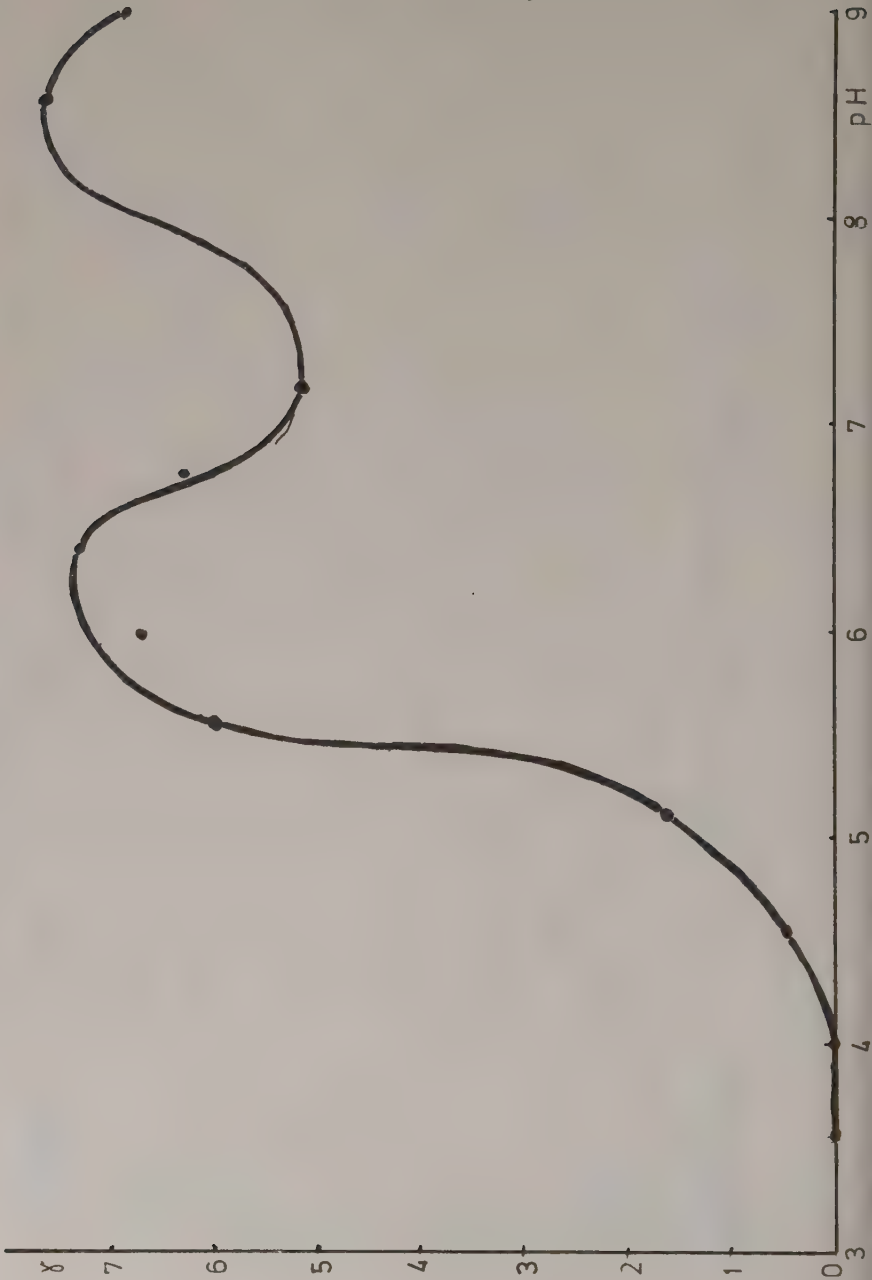


Abb. 4. Zur Bestimmung der Michaeliskonstante: Abhängigkeit der Substrat-Umsatzrate von der Substratkonzentration



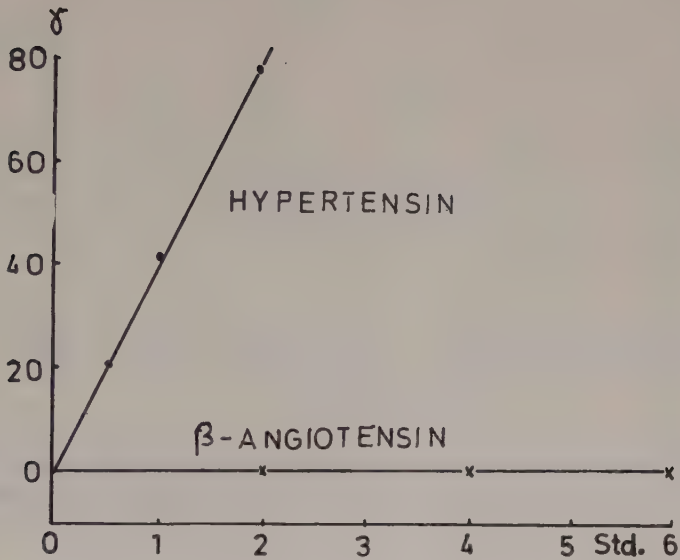


Abb. 6.

Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeit von α -L-AT II-Amid (Hypertensin Ciba) und β -L-AT II in menschlichem Plasma

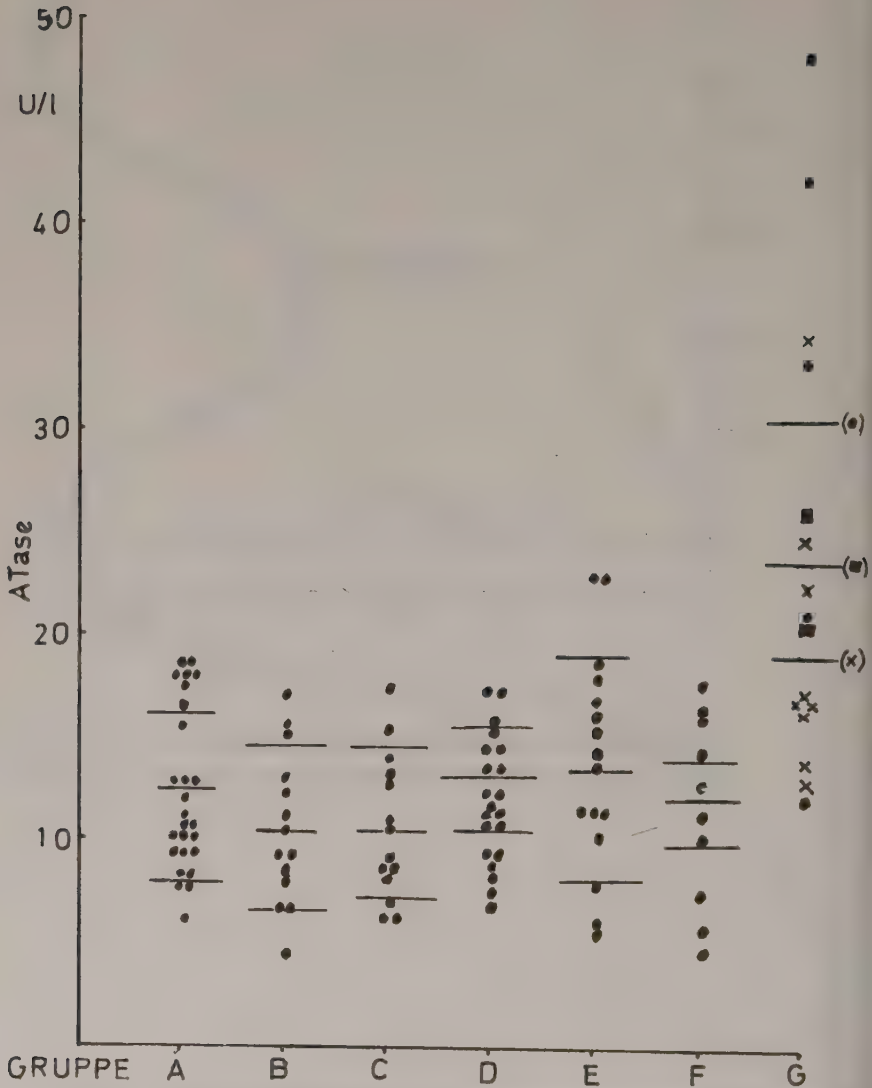


Abb. 7. Einzelergebnisse der ATase-Bestimmungen mit Gruppenmittelwerten und einfacher Standard-Abweichung
 x = Lebercirrhose; • = Hepatitis epid.; ■ = Verschlußikterus

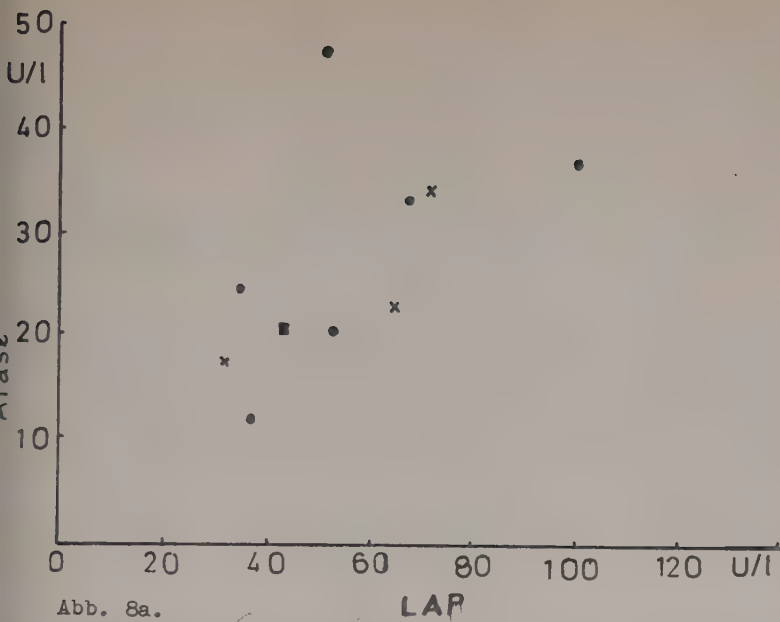


Abb. 8a.

LAP

Beziehungen zwischen der ATase- und der LAP-Aktivität bei Leberkranken (Erklärung der Symbole s. Abb. 7.)

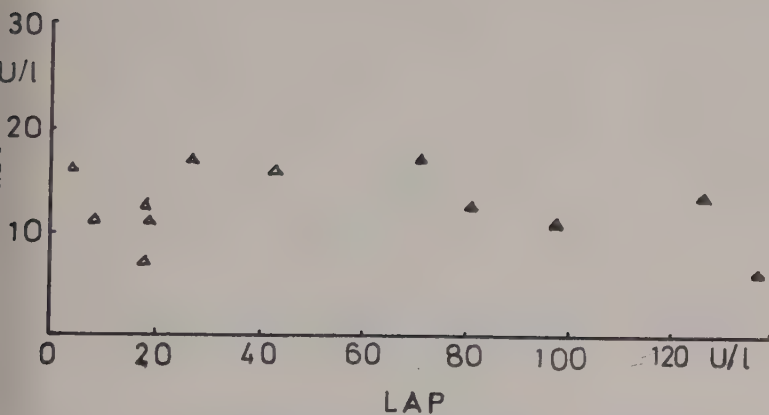


Abb. 8b. Beziehungen zwischen der ATase- und der LAP-Aktivität bei Schwangeren.
(△ = 1. Trimenon; ▲ = 3. Trimenon)

LEBENS LAUF

Am 25. März 1941 wurde ich als Tochter des Landwirts Hans Dedo von Goldacker und seiner Ehefrau Rosemarie geb. Preuße in Braunau, Kreis Lüben, Niederschlesien geboren. 1945 flüchteten wir nach Göttingen. Dort wurde ich Ostern 1947 eingeschult. Im Frühjahr 1951 kam ich auf das Göttinger Mädchen-Gymnasium. 1954 erhielt ich ein Stipendium der Hermann Lietz-Schule Hohenwehrda in Hessen, wo ich am 8. März 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1960 begann ich in Göttingen mit einem Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes mit dem Medizinstudium. Dort blieb ich bis zum Wintersemester 1961; im April 1961 legte ich das Vorphysikum ab. Aus persönlichen Gründen unterbrach ich dann mein Studium für drei Semester. Ich nahm es 1963 in Göttingen wieder auf. Dort legte ich im April 1964 das Physikum ab.

Nach einem weiteren Semester in Göttingen ging ich für ein Jahr nach Schottland, wo ich im Winter 1964/65 und im Sommer 1965 mein Medizinstudium an der Universität von Aberdeen fortsetzte. Anschließend immatrikulierte ich mich an der Freien Universität Berlin, wo ich am 28. März 1968 mein Studium mit dem Staatsexamen abschloß.

Die Medizinalassistentenzeit leistete ich in Berlin zwischen Mai 1968 und Januar 1970 ab.

Seit 1967 bin ich verheiratet.

